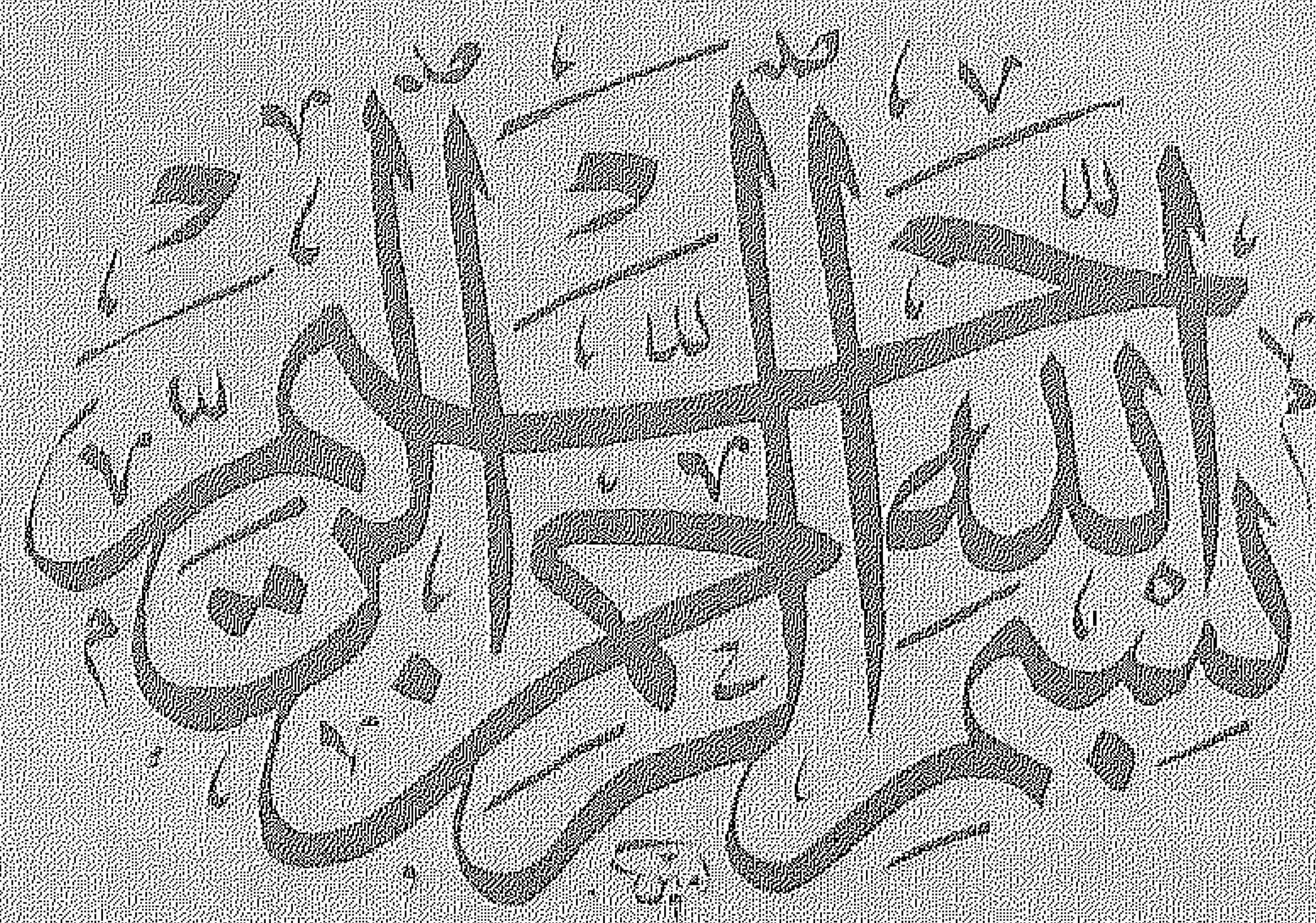
TOXINOLOGY

علم سموم البكتيريا

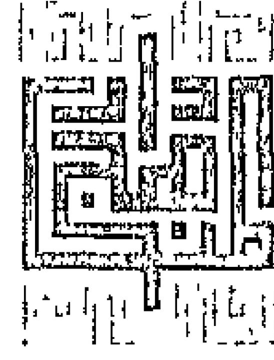
أ.د. رحاب رشيد العزاوي





T O X I N O L O G Y

علم سموم البكتيريا



دار المناهج للنشر والتوزيع
عمان /الأردن / شارع الملك حسين
بناية الشركــة المتحدة للتأمين
هاتف 4650624 فاكس 4650664
ص.ب / 215308عمان 11122 الأردن

Dar Al-Manahej
Publishers & Distributor
Tel : (00962 6) 4650624
fax: 009626 4650664
Amman-King Hussein St.
P.O.Box: 215308 Amman 11122 Jordan
www.daralmanahej.com
info@daralmanahej.com
manahej9@hotmail.com
fayiz@daralmanahej.com

المملكة الأردنية الهاشمية
رقم الإيداع لدى دائرة المكتبات والوثائق الوطنية
2009/1/229

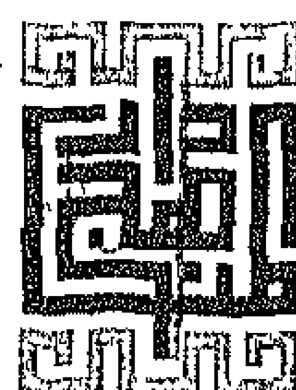
615.9
االعزاوي ، رحاب
علم سموم البكتيريا / رحاب رشيد العزاوي
عمان - دار المناهج 2009
( ) ص
ر.إ: 2009/1/229
الواصفات: السموم / التسمم / الفطريات / الجراثيم

* تم إعداد بيانات الفهرسة والتصنيف الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

TOXINOLOGY

علم سموم البكتيريا

تأليف
الدكتورة رحاب رشيد العزاوي
جامعة صنعاء - كلية العلوم
قسم علوم الحياة



دار المناهج للنشر والتوزيع

الإهداء

إلى وطني الجريح العراق

أعزه الله ورفع رايته عالية خفاقة

وجمع شمل أهله ليكونوا كما كانوا

عبر العصور أهل العلم والجهاد لنصرة

قضايا أمتنا العربية والإسلامية

المؤلفة

المحتويات

الفصل الثالث

التركيب الكيميائي للسموم المؤثرة على أمراض النبات

Chemical Structure of toxins effect in plant diseases.

الفصل الرابع

ميكانيكية فعل السموم

Mechanism of toxins action.

الفصل الخامس

الأنشطة الايضية لبناء وانحلال السموم

Metabolic activities of toxin synthesis and degradation.

الفصل السادس

دور السموم في نشوء المرض

Role of toxins in pathogenicity.

الفصل السابع
الاختبار الإحيائي لفعالية السموم
Toxins bioassay.

الفصل الثامن
السموم البروتينية البكتيرية (السموم الخارجية)
.Bacterial protein toxins (Exotoxins)

الفصل التاسع

تصنيف السموم البكتيرية البروتينية (السموم الخارجية) على أساس تركيبها وآلية فعلها

Classification of bacterial protein toxins (Exotoxins) their structure and or mode of action according to

الفصل العاشر

السموم البكتيرية الداخلية

Bacterial endotoxins

الفصل الحادي عشر

المصطلحات والمراجع



مُقَدِّمَة

أبدأ بحمد لله وشكره أن وفقني لإعداد هذا الكتاب، بلغتنا العربية الجميلة ليكون مدخلا في علم سموم البكتيريا ، يستعين به المختصون والباحثون وطلبة الجامعات والدراسات العليا.

يضم الكتاب أحد عشر فصلا شملت معلومات منسقة عن سموم البكتيريا المؤثرة في علم أمراض النبات ، الحيوان والإنسان .

عنيت هذه الفصول بتقديم تفاصيل شاملة عن هذه السموم ذات التأثير الضار للنبات، الحيوان والإنسان .

أهتم الكتاب بدراسة تصنيف، تركيب، إنتاج، آلية فعل، تقييم ودور السموم في نشوء المرض و الامراضية . كما قدم بعض المخططات والرسوم التوضيحية والصور، وأحتوى على شرح للمصطلحات العلمية وكذلك المراجع العلمية.

في الختام أرى أنه من الواجب أن أتقدم بالشكر والتقدير إلى كافة الزملاء من الأساتذة والباحثين الذين شجعوني على إصدار هذا الكتاب.

وفق الله الجميع لخدمة أمتنا العربية المجيدة.

المؤلفة
د. رحاب رشيد طه العزاوي

1

الفصل الاول
السموم البكتيرية
Bacterial Toxins

مقدمة عامة

يعتبر هذا الكتاب مدخلاً في علم السموم البكتيرية(bacterial toxins) وهو جزء من علم السموم الميكروبية (Microbial toxins) أو (Toxinology) والذي يشكل احد الفروع الهامة والبارزة في علم الميكروبيولوجي (Microbiology).

تم مناقشة واستعراض الأساسيات المهمة والثابتة والآراء والأفكار والمشاريع البحثية المتشابهة والمختلفة، المتوافقة والمتناقضة، التي يتبناها العلماء والباحثون ليتسنى للقارئ الإطلاع على كل الحقائق والملابسات (والغموض أحيانا) الواردة في هذا العلم لكونه من العلوم الحديثة.

وبالرغم من أن الكثير من هذا العلم قد تم اكتشافه ودراسته إلا إن الأكثر لم يتم إثباته بعد.

يعتبر هذا الكتاب مرجعاً شاملاً لمعظم السموم البكتيرية، سواءً تلك التي تؤثر في علم أمراض النبات (Plant pathology) أو علم أمراض الإنسان والحيوان(Human and animal pathology).

إن علم السموم البكتيرية هو علم قائم بحد ذاته، إلا إنه مرتبط ارتباطاً وثيقاً بمختلف فروع العلوم الأخرى. ويتطلب معرفة متينة وعميقة في علم أمراض النبات والإنسان والحيوان وفي علم الكيمياء الحياتية (biochemistry) لإجراء التحليلات اللازمة للكشف عن الاختلال الوظيفي الحاصل نتيجة فعل السموم كما يرتبط بعلم فسلجة الأعضاء (Physiology)، وفي تحديد العلاقات المختلفة بين الأحياء المضيفة (host) والأحياء الجهرية المتطفلة (parasites) وبين الأحياء الجهرية المختلفة فيما بينها. إن الخبرة والمعرفة الفنية ومتابعة التطورات الحديثة في طرق الكشف والتشخيص والتحليل للمواد البيولوجية أصبحت ضرورة لازمة للتوصل إلى أفضل النتائج في العزل والتنقية والتشخيص لتحديد التركيب الكيميائي والشكل والترتيب والصيغة الفعالة التي تعمل فيها السموم.

وبخصوص الأنواع البكتيرية (Bacterial species) التي لها دور وعلاقة مباشرة في هذا العلم تقسم إلى قسمين رئيسين حسب تأثيراتها وأمراضيتها للكائنات الحية كالتالي، القسم الأول المرتبط بعلم أمراض النبات والقسم الثاني المرتبط بعلم أمراض الإنسان والحيوان.

ففي علم أمراض النبات هناك ثمانية أجناس بكتيرية ممرضة للنبات هي:

Agrobacterium. Corynebacterium. Eriwinia. Pseudomonas..Xanthomonas. Rhizobium Streptomyces. Mycoplasma.

هذه الأجناس تحتوي على حوالي 200 نوع ممرض للنبات كما هو مدرج في Bergy's manual (الطبعة الثانية،2004).

إلا أن الأجناس المعروفة والمثبتة في إنتاجها أو تكوينها للسموم والمتداولة في علم أمراض النبات هي *Agrobacterium*، *Corynebacterium*، *Erwinia*، *Pseudomonas*، *Xanthomonas Rhizobium*.

أما أنواع البكتيريا المؤثرة في علم أمراض الإنسان والحيوان فهي عديدة ومتنوعة وتنحدر من عدة أجناس أهمها على سبيل المثال لا الحصر هي :

1 *Bacillus, Streptococcus, Staphylococcus , pseudomonas, Corynebacterium, Clostridium,Camylobacter,* و *Vibrio.*

إن الكائنات الجهرية المرضة تكون مسلحة بمواد سامة والتي تسبب تأثيراً ضاراً جداً للمضيف.

يتداول في الأدبيات العلمية ذكر مجموعتان رئيسيتان من السموم هي : السموم الخارجية (Exotoxin) والسموم الداخلية (Endotoxin) Stephen and (Pietrowski, 1991).

إن السمية Toxigenicity أو توليد السمية (toxigenesis) أو ما يعرف بإنتاج السموم هي ميكانيكية أو آلية بواسطتها تتمكن البكتريا من أحداث المرض (Todar, 2008). من الناحية الكيماوية هناك نوعان من السموم البكتيرية، والمتمثلة بالمواد الدهنية المتعددة السكريات (Lipopolysaccharides) والمرتبطة بالجدار الخلوي لبكتريا السالبة لجرام (Gram negative bacteria). والنوع الأخر هو البروتينات التي تفرز أو تحرر من الخلايا البكتيرية والتي تعمل على مواقع معينة (sites) في الأنسجة الحية التي يتطور فيها المرض لاحقا.

إن الدهنيات المتعددة السكريات المرتبطة بالخلية والتي يرمز لها بـ LPS هي سموم يشار إليها بالسموم الداخلية، أما السموم التي تنتشر خارج الخلية إلى الوسط الذي تنمو فيه البكتيريا فتسمى بالسموم الخارجية، ولزمن غير بعيد كان يعتقد بأن إنتاج السم الخارجي هو صفة متميزة لبكتريا الموجبة لجرام، ولكن بعدها وجد أن بكتريا الموجبة لجرام وكذلك بكتريا السالبة لجرام تنتج سموم بروتينية ذائبة.

إن السموم الداخلية هي المواد المرتبطة بالخلية والتي هي المكونات التركيبية للغشاء الخارجي لبكتريا السالبة لجرام. ومهما يكن الحال فإن السموم الداخلية ربما تحرر كنتيجة للوسائل الدفاعية للمضيف (مثال ذلك إفراز انزيم Lysozyme) أو نتيجة لفعالية بعض المضادات الحياتية مثل البنسلين (Penicillin) والسيفالوسبورين (Cephalosporine) .

إن السموم الخارجية تفرز اعتيادياً بواسطة الخلايا البكتيرية ولكنها في حالات خاصة أو معينة تتحرر عند تحلل الخلايا البكتيرية.

لذلك فإن أي من الاثنين (السموم الداخلية والسموم الخارجية) ممكن ان يعمل بالقرب أو بالترابط مع الخلايا المنتجة للسم أو في مواقع النسيج أوعن بعد (remote) من نقطة الغزو البكتيري أو النمو البكتيري.

قسماً من السموم البكتيرية ممكن ان تعمل في الموقع الذي يحدث فيه عملية إستعمار النسيج (Colonization) وتلعب دوراً في عملية غزو النسيج السليم (Schlessinger and Schaechtes, 1993).

تعتبر السموم البروتينية البكتيرية هي الأكثر سمية للإنسان من بقية السموم الأخرى وتبقى بفعالية عالية جداً في التخافيف العالية منها.

إن قابلية إنتاج السم هي خاصة بأنواع معينة من الأنواع البكتيرية (Bacterial species) التي تسبب أو تنتج المرض المرتبط بذلك السم. فمثلاً بكتريا الـ (*Clostridium tetani*) هي التي تنتج سم الكزاز وتسبب مرض الكزاز وكذلك بكتريا الخناق (*Corynebacerium diphtheriae*) هي الوحيدة التي تنتج سم الخناق مسببة مرض الخناق. وكذلك الحال بالنسبة للسموم الفعالة في علم أمراض النبات، على الرغم من أن قسماً منها لا يكون متخصص في إصابة المضيف إلا إنها متخصصة في المرض الذي تسببه للمضيف (Durbin , 1991).

إن مصطلح الإصابة والمرض غالباً تستخدم بشكل مترادف في مناقشة المضيف والطفيل والعلاقة بينهما. عندما يحصل الاتصال بين الكائن الحي المجهري وبين المضيف فإن ثلاثة أشياء ممكن ان تحدث وهي: 1. ان المضيف لا يستجيب لوجود الكائن الحي المجهري وبالتالي يعمل الكائن الحي المجهري كمستعمر للمضيف (Colonizer). 2. أن المضيف ممكن أن يستجيب للكائن الحي المجهري ويعمل على إنتاج الأجسام المضادة (antibodies) وبذلك فإن عملية الإصابة (infection) تحدث.3. أن المضيف يستجيب للكائن الحي المجهري ويبدأ بإنتاج أي المضيف الأجسام المضادة ولكن الكائن الحي المجهري يعمل على أحداث تلف أو تدمير في أنسجة المضيف، وبالتالي حدوث المرض (disease).

هناك مصطلحان آخران هما الأمراضية أو المرضية (pathogenicity) والفوعة أو الضراوة (virulence) إن الكائن الحي المجهري الذي له القدرة على أحداث أو ان يسبب مرض يسمى بالكائن الممرض (pathogen) علما بأن هناك كائنات حية مجهرية أكثر إمراضية من الأنواع الأخرى. أي ان الأمراضية هي مصطلح نوعي (qualitative term) والتي تصف الطاقة الكامنة أو القابلية الكامنة للكائن الحي المجهري على إحداث مرض معين.

أما المصطلح الذي يتعامل مع المواصفات أو القياسات الكمية للكائن الحي المجهري وقابليته عن التعبير عن شدة المرض فيدعى بالفوعة أو الضراوة (Virulence) وهو مصطلح كمي (quantitative term) فمثلاً ان عدد الكائنات المجهرية أو كمية منتجاتها الميكروبية من السموم هي التي تعطي الصورة الكمية لحالة المرض. وعادة فإن السلالات البكتيرية ذو الفوعة (Virulent) هي التي تنتج السم بينما غير ذي الفوعة لا تعمل على ذلك. ان السم يعتبر المحدد الرئيسي (Major determinant) للفوعة (Songer,1997 ; Todar, 2007).

إن فوعة أو ضراوة الكائن الحي المجهري يمكن ان تحور في المختبر فهناك مثلاً أحياء مجهرية عالية الفوعة أو الضراوة يمكن ان تضعف أو تفقد فوعتها

خلال النقل المتكرر في الأوساط الزراعية الغذائية (cultur (media، أو من خلال تكرار حقنها في مضايف (host) لا تمثل المضايف الطبيعية لها والتي بالنتيجة تسبب أضعاف صورة كمية المرض. تشير بعض المراجع العلمية بأن فوعة الكائن الجهري تتعلق بقابليته إما على،غزو النسيج (invasiveness) أو إنتاج السم الذي يؤثر على الأنسجة (Lottenberg *et al.*, 1994 ; Todar, 2008).

هناك العديد من عوامل الفوعة (الضراوة) المعروفة والتي تساهم في تطور المرض في الكائنات الحقيقة النواة ومنها الإنسان قد وجد بأنها تحدث بعد أن تصاب الجرثومة (البكتيريا) بالفاج (الفيروس) حيث يندمج جين الفاج مع كرموسوم البكتيريا مكوناً نواتج معينة منها السموم كما في حالة سموم، البوتيوليني، الكوليرا، الخناق، والشجيلا (Abedon, 2005).

ان هذه السموم ربما تفرز من قبل البكتريا في الأغذية التي يتم تناولها بواسطة المضيف (الإنسان أو الحيوان). ان معظم هذه السموم البكتيرية تصنف ضمن المعديات (infectious) أي ان الجرثومة يجب نقلها إلى المضيف. ان مصدر الجرثومة أما ان تنقل من مضيف إلى أخر أو تنقل من مستودع مرضي (disease reservoir).

في علم أمراض النبات قد تلعب السموم، أحياناً دوراً فاعلاً في موضوع علاقة الطفيل بالمضيف (host-parasite relation) إلا انه من المفيد ذكره ان هناك حالات يمنع فيها الكائن الممرض (الطفيلي) من دخول المضيف (النبات) أو يقتل أو يثبط قبل دخوله للنبات في حين نجد ان بعض السموم المفرزة من الكائنات الممرضة تؤثر على المضيف حتى قبل ملامستها له.

إن جميع المراجع العلمية تشير إلى أن ميكانيكية أمراضية الأحياء الجهرية ومنها البكتيريا في أحداث المرض تعتمد على عدة محاور منها قابلية الكائن الممرض للارتباط بالمضيف، تغلب الكائن المرض على كل الآليات الدفاعية للمضيف،

الحث على تدمير الأنسجة وحدوث الاختلال الـوظيفي وإفـراز الأنزيمـات وإنتـاج السموم وجميع هذه المراجع تؤيد ان السموم البكتيرية هـي المـسبب الرئيـسي لتلـف الأنسجة الحيوانية خلال عملية المرض(Alouf and Popoff, 2006).

السموم الميكروبية لها القدرة على إعاقة أو تعطيل أو الإفراط في تحفيز عـدة 1
وظائف هامة في الخلايا الحقيقية (Eucaryotic cells) التي تصاب بخلايا البكتيريا. وعلى فرض ان هذه السموم تمنح أو تعطي بعض الفوائد إلى الخلايا البكتيرية أما خلال مرحلة تطور العلاقة بين المضيف والطفيـل (البكتيريـا) أو أثنـاء مواجهـة البكتيريا لصعوبات في المحيط التي تعيش فيه.

بعض السموم البكتيرية تعمـل علـى سـطح الخلايـا الـتي تمثـل هـدفاً لهـا لإحداث ضرر لا يمكن إصلاحه في غشاء الخليـة أو تُغـير مـن نقـل الايعـازات الطبيعية في الخلايا الحقيقيـة (لخلايـا المـضيف). بعـض مـن الـسموم البكتيريـة الخارجية لها القابلية على إحداث الضرر للغشاء البلازمي (Plasma membrane) للخلايا الحقيقية. وإن الضرر قد لا يقتصر على تحليل الخلية وإنما يسهل عملية انتشار البكتيريا في النسيج الحي. ان السموم التي تـسبب هـذا التلـف أو الـضرر الخلوي تحدثه أما بواسـطة التحليـل الأنزيمـي أو بواسـطة أحـداث مـسامات أو ثقوب (Pores) في الغشاء الخلوي.

هناك سموم أخرى تظهر فعالية أنزيمية حالما تتـاح فرصـة للجزئيـة الـسامة بالدخول إلى سايتوبلازم الخلية الحساسة.إضافة إلى أنواع أخرى من السموم التي تعمل على إيقاف الوظائف الحيوية للخلايا الطبيعية.

وهناك من يرى انه على الرغم من التأثير الضار الذي تسببه السموم أثناء عملية الإصابة للمضايف المعرضة لها، إلا إن لهـا دور إيجـابي حيـث تـستثمر كمجـس أو متحسس لسير الفعاليات الحيوية للخلايا الحقيقية أو في التطبيقات الطبية. هناك قول مأثور "لا تقتل الرسول" "Don't shoot the Messenger" أن هذا القول ينطبـق علـى

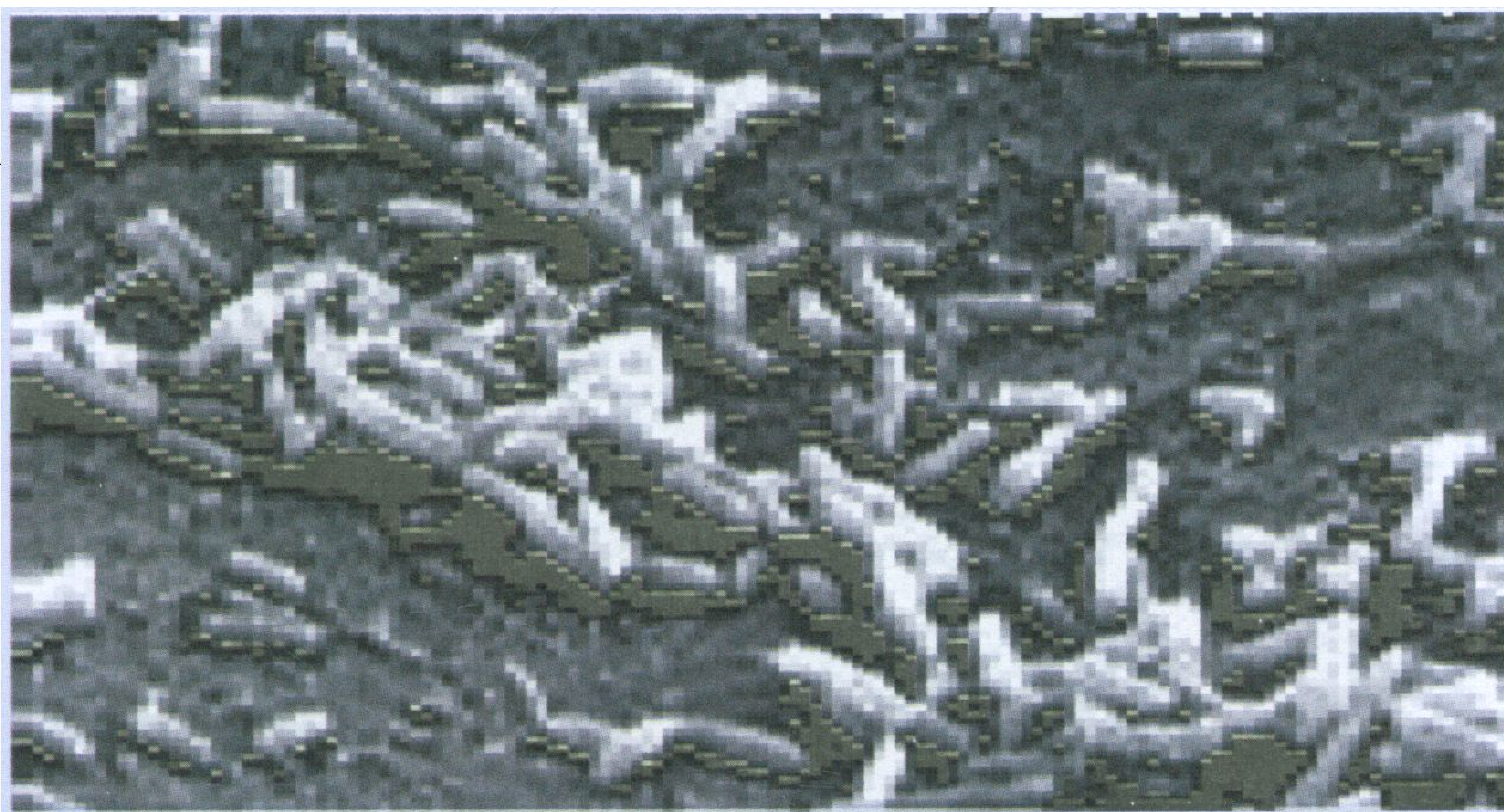
سموم البكتيريا حيث ان هذه السموم تؤثر مباشرة على أهداف معينة في الخلايا المختلفة وتغير من وظائف البروتينات الخلوية دون ان تقتل الخلايا. السموم البكتيرية لها القدرة على تحوير مسارات الرسل الثانوية (Secondary messengers) والتي بدورها تحدث تغيرات جوهرية أو دراماتيكية في بث إشارات لإدامة الوظائف الخلوية، من أمثلة هذه السموم هي (Cytotoxic necrotizing factor (CNF والسم المعوي الثابت بالحرارة heat table enterotoxin، إن الإشارات التي ترسلها هذه السموم تعمل على اتخاذ التحوطات من قبل الخلية أو تنبيه الخلية عن حدوث خلل معين (Aktories, 1997 ; flatau *et al.*, 1997).

تشير الأدبيات العلمية الحديثة أن البحوث المتعلقة بالسموم الميكروبية المنتجة بواسطة الكائنات المرضة والمثبتة (المعروفة) أو التي تظهر للعيان تعطي معلومات مستحدثة وجديدة حول دور ذلك السم في المرض توضح خواص خلايا المضيف التي دمرت بواسطة ذلك السم.

أخيراً لابد من الإشارة، على الرغم من الاختلافات الواضحة بين السموم البكتيرية المؤثرة في علم أمراض النبات عن تلك الفاعلة في علم أمراض الإنسان والحيوان من حيث طبيعتها، تركيبها الكيماوي، آلية أو ميكانيكية فعلها، الأهداف التي تؤثر عليها، دورها في الامراضية وفي تحديد الأعراض المرضية المرئية والتغيرات الكيميائية الناتجة عن ذلك وما تسببه من اختلال وظيفي في خلايا المضيف إلا أنها وضعت جميعاً ضمن هذا الكتاب لانحدارها من أصل مجهري واحد هو البكتيريا.

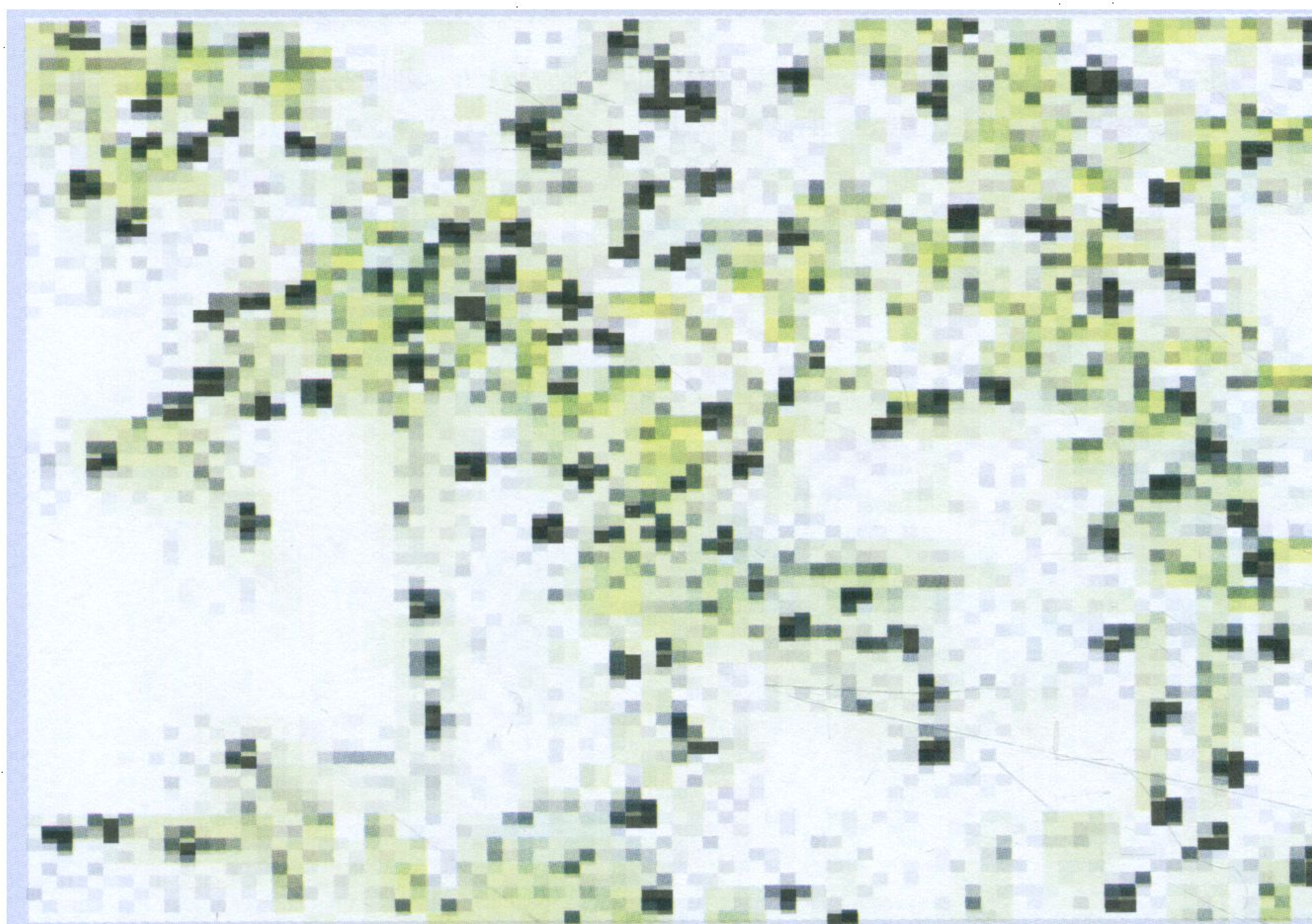
فيما يلي صور وأشكال وتجمعات بعض أنواع البكتيريا المرضية المنتجة للسموم والمؤثرة على النبات، الحيوان والإنسان.

1



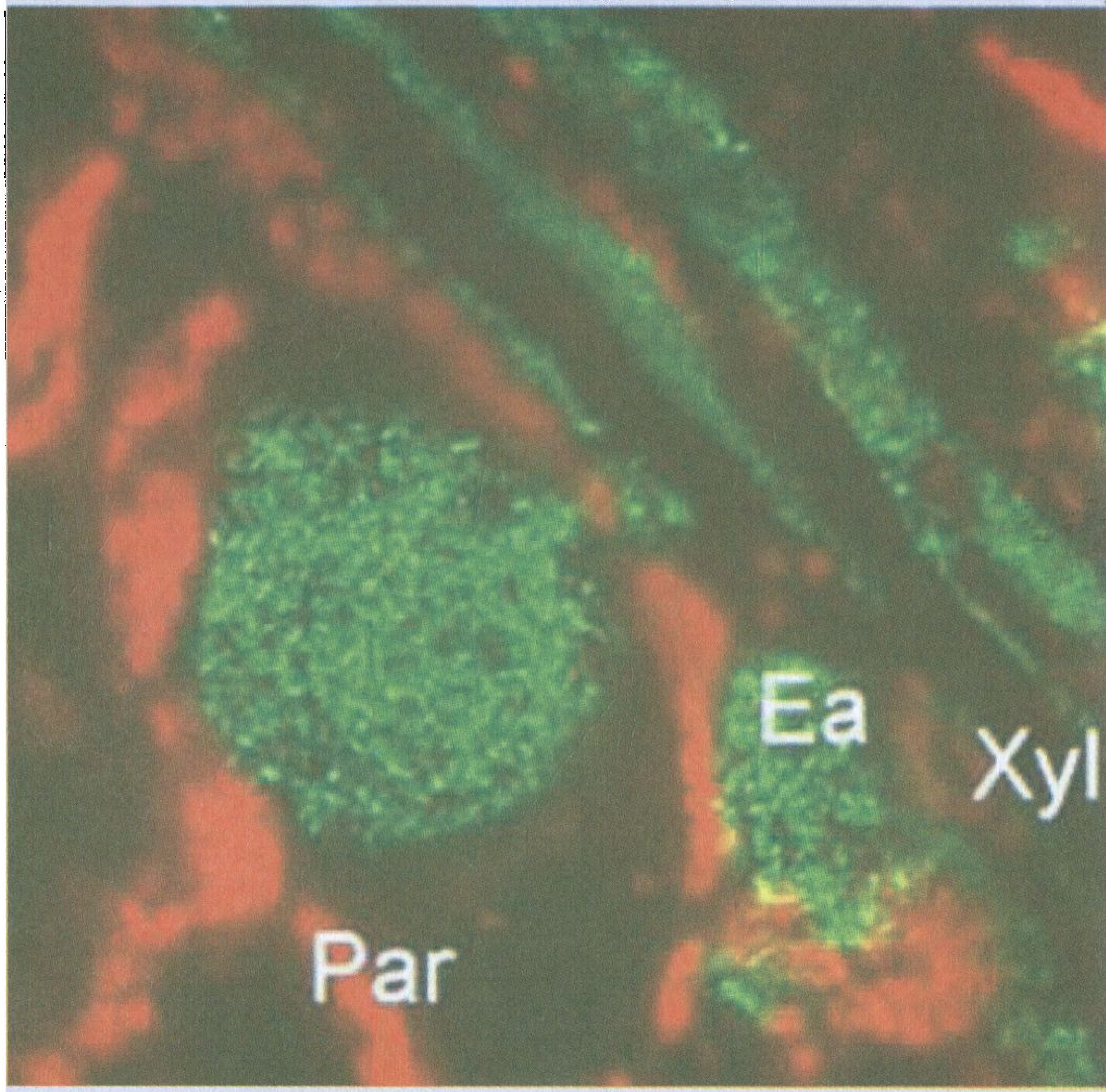
بكتيريا *Agrobacterium*

www.bio.da.vidson.edu



بكتيريا Corynebacterium الممرضة للنبات

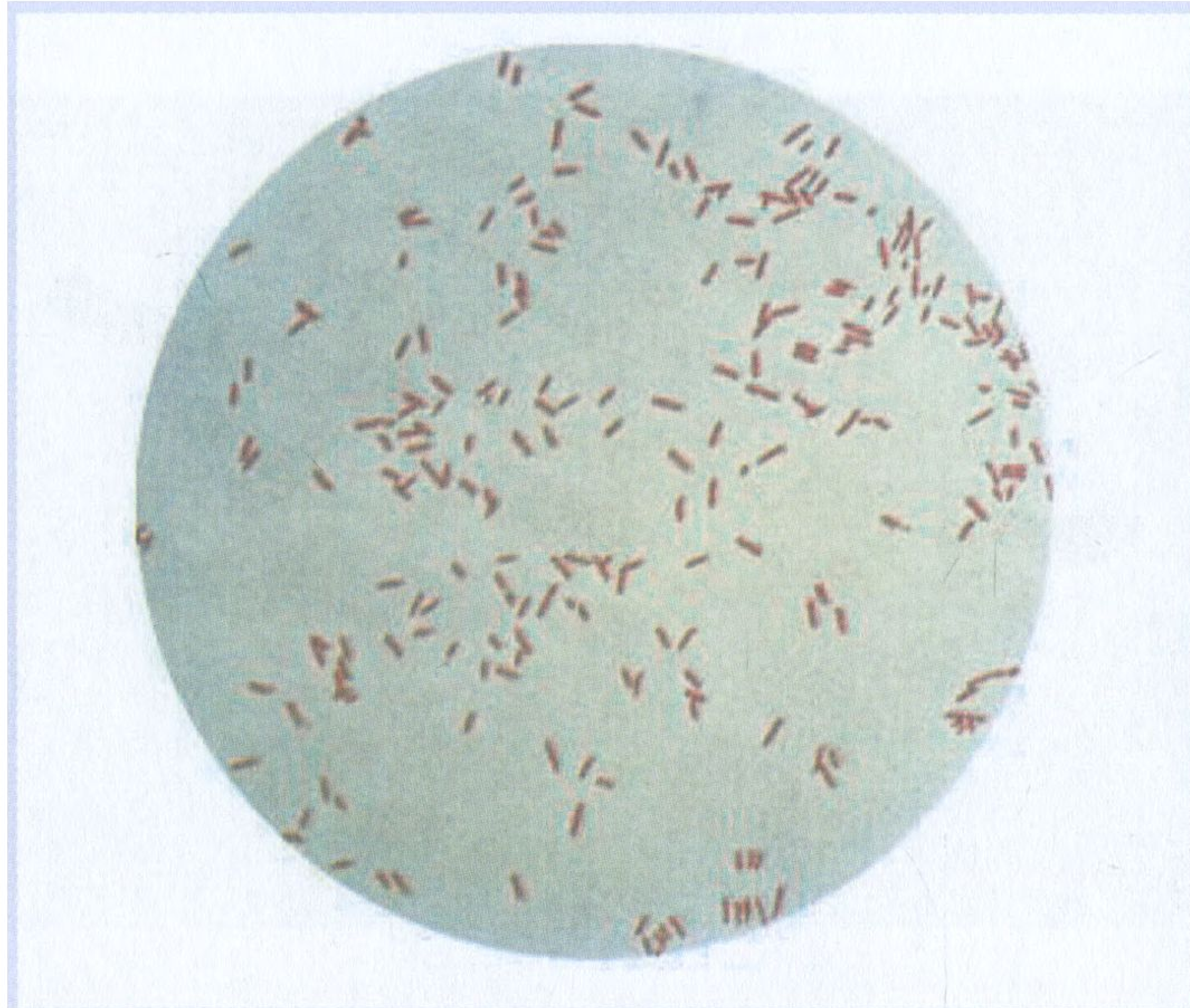
filebox .vt.ed



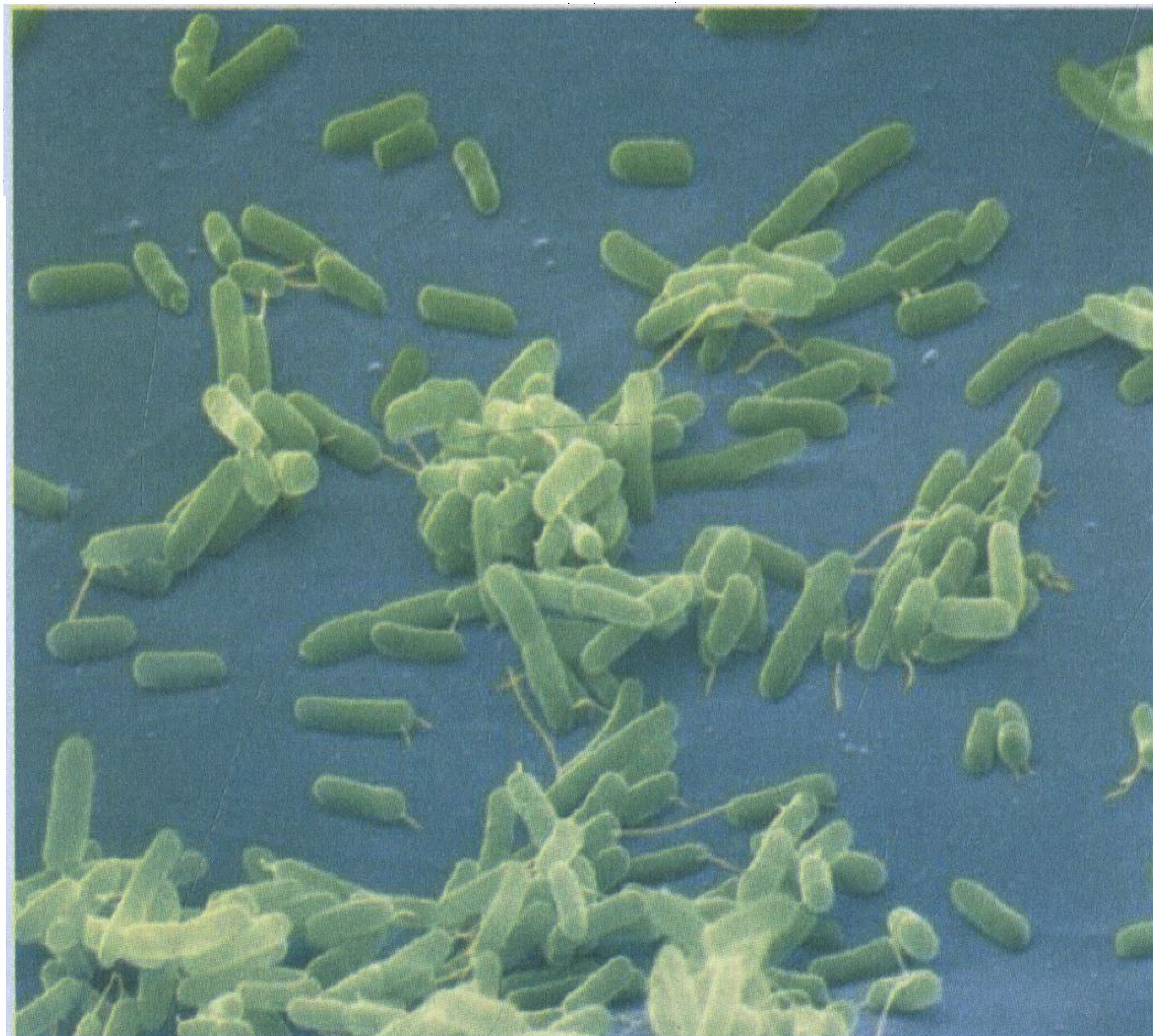
بكتيريا ال *Erwinia amylovora* على أوراق التفاح
www.pflanzen-im-web-de/pflanzen/pflanzen-such



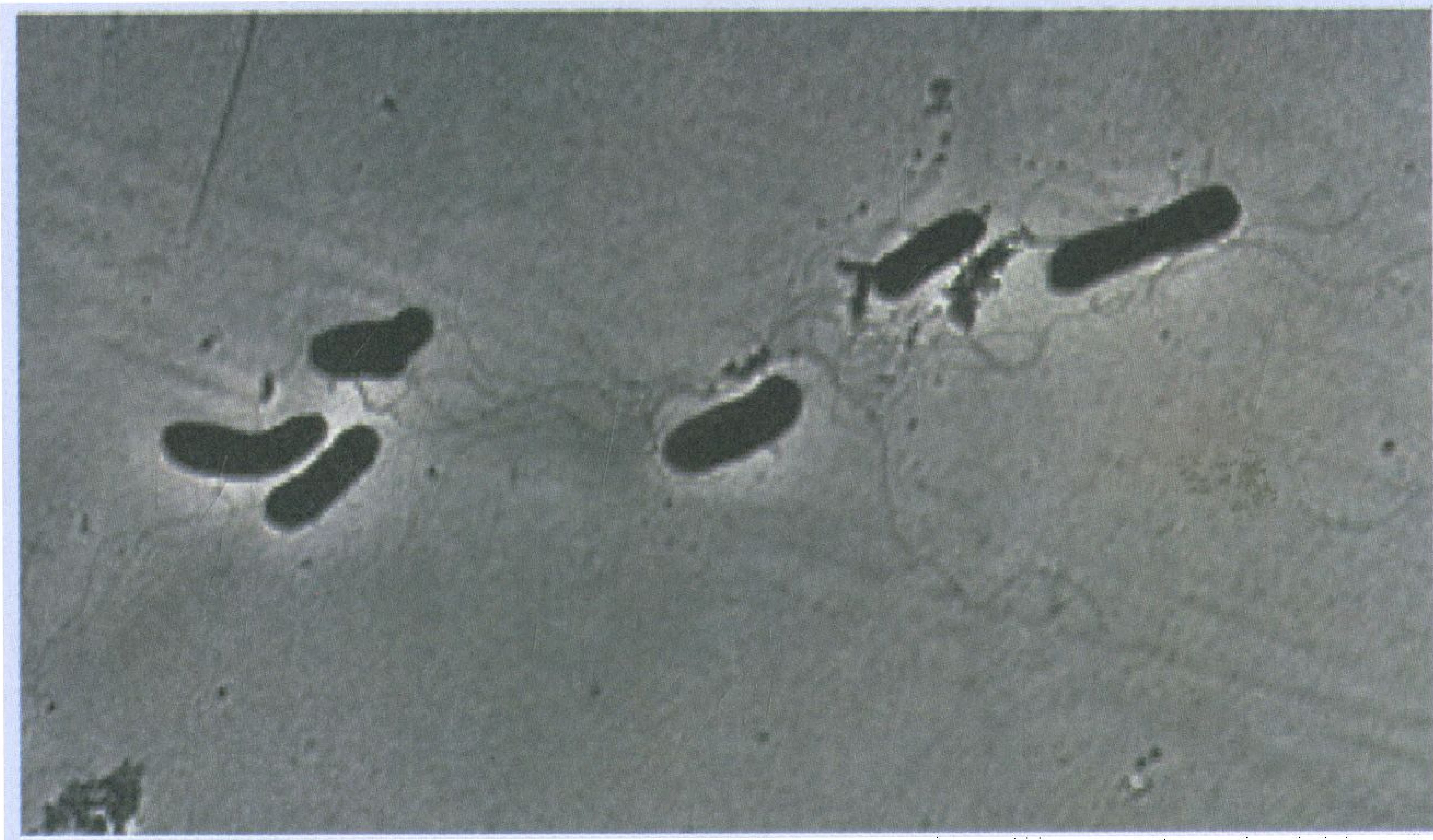
بكتيريا جنس *pseudomonas* (Todar, 2008)



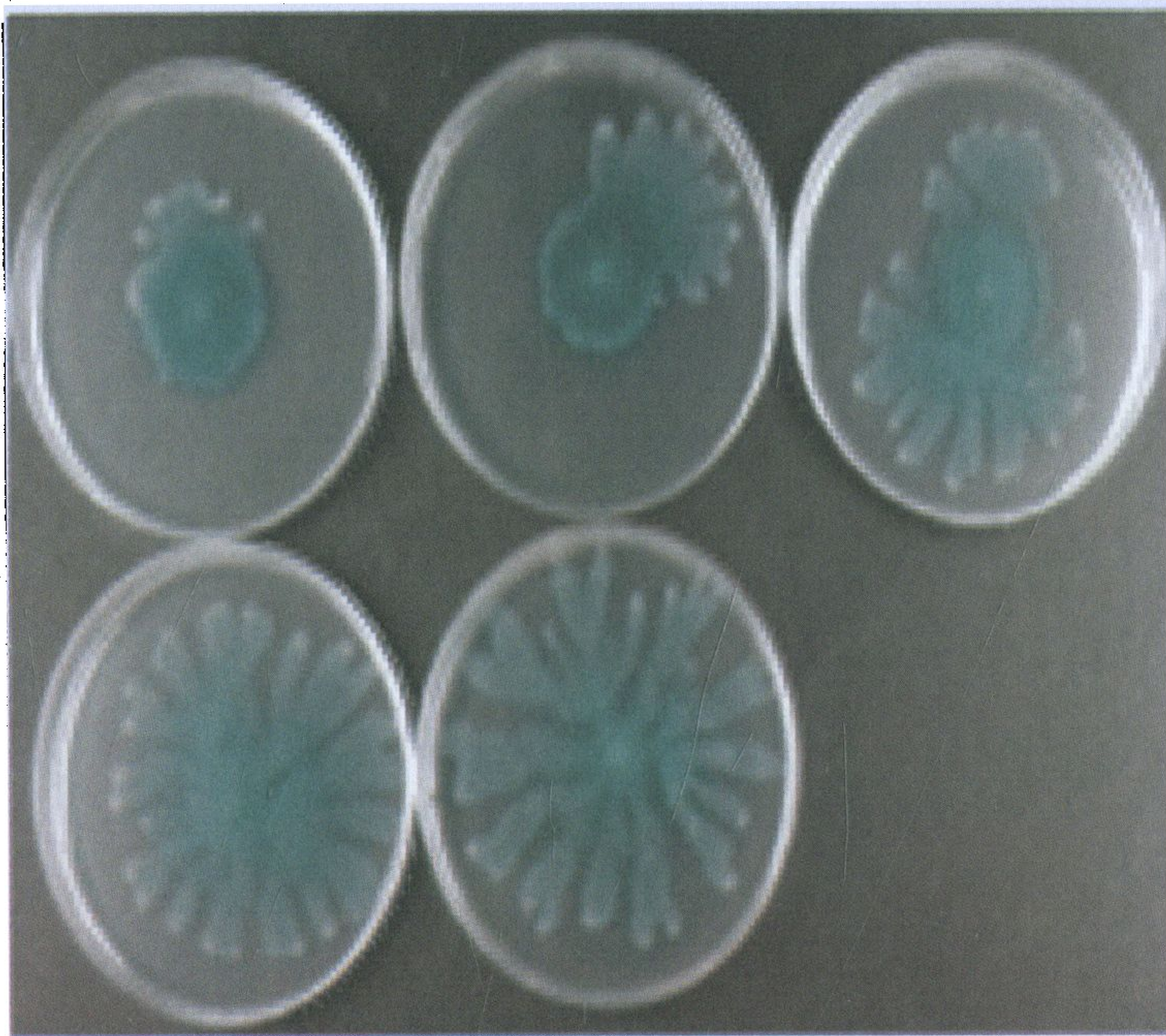
بكتيريا pseudomonas في النبات
Microbewiki.kenyon.edu/index.php./pseudomonas



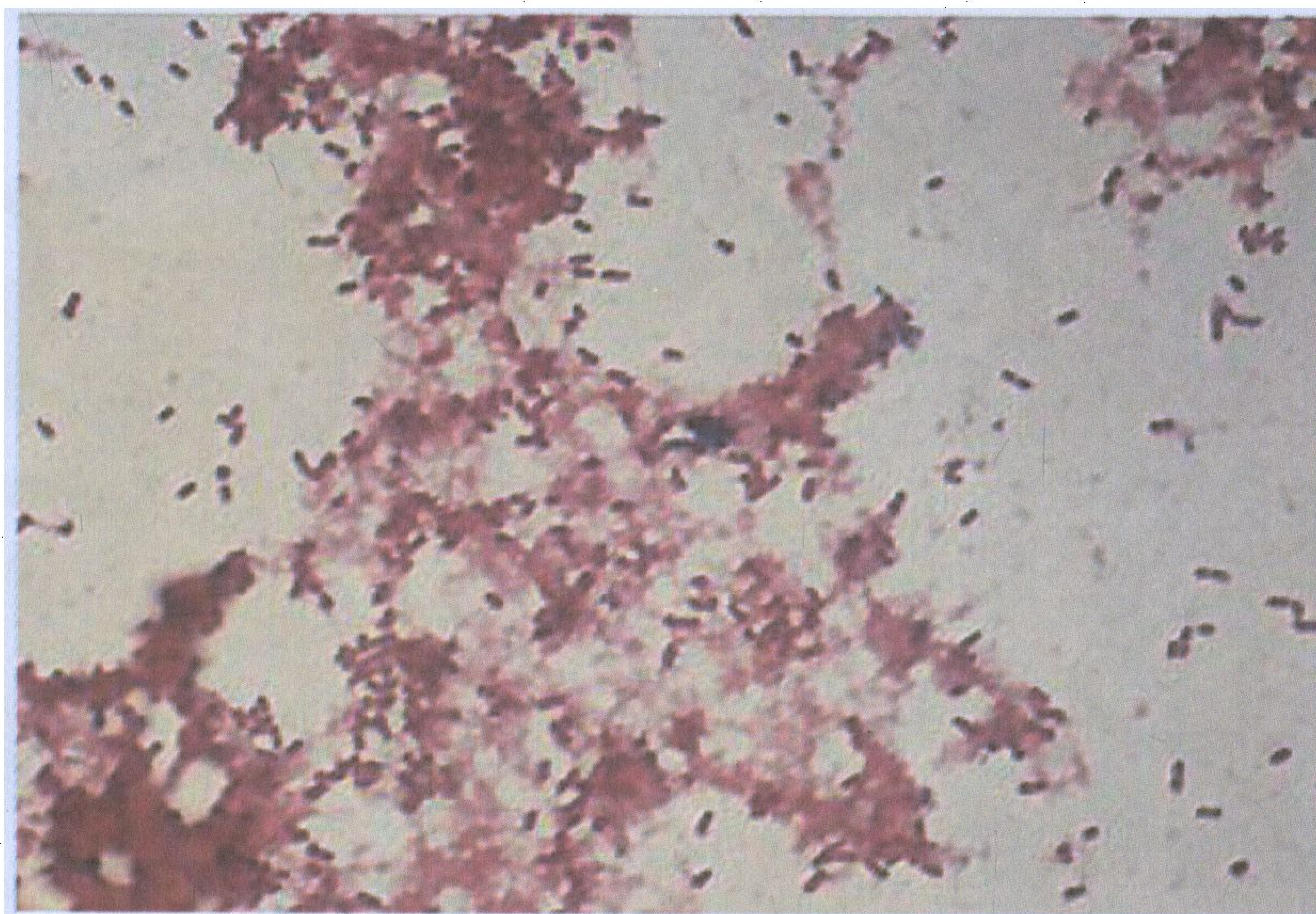
خلايا بكتيريا Pseudomonas الممرضة للنبات
www.sciencemusing.co



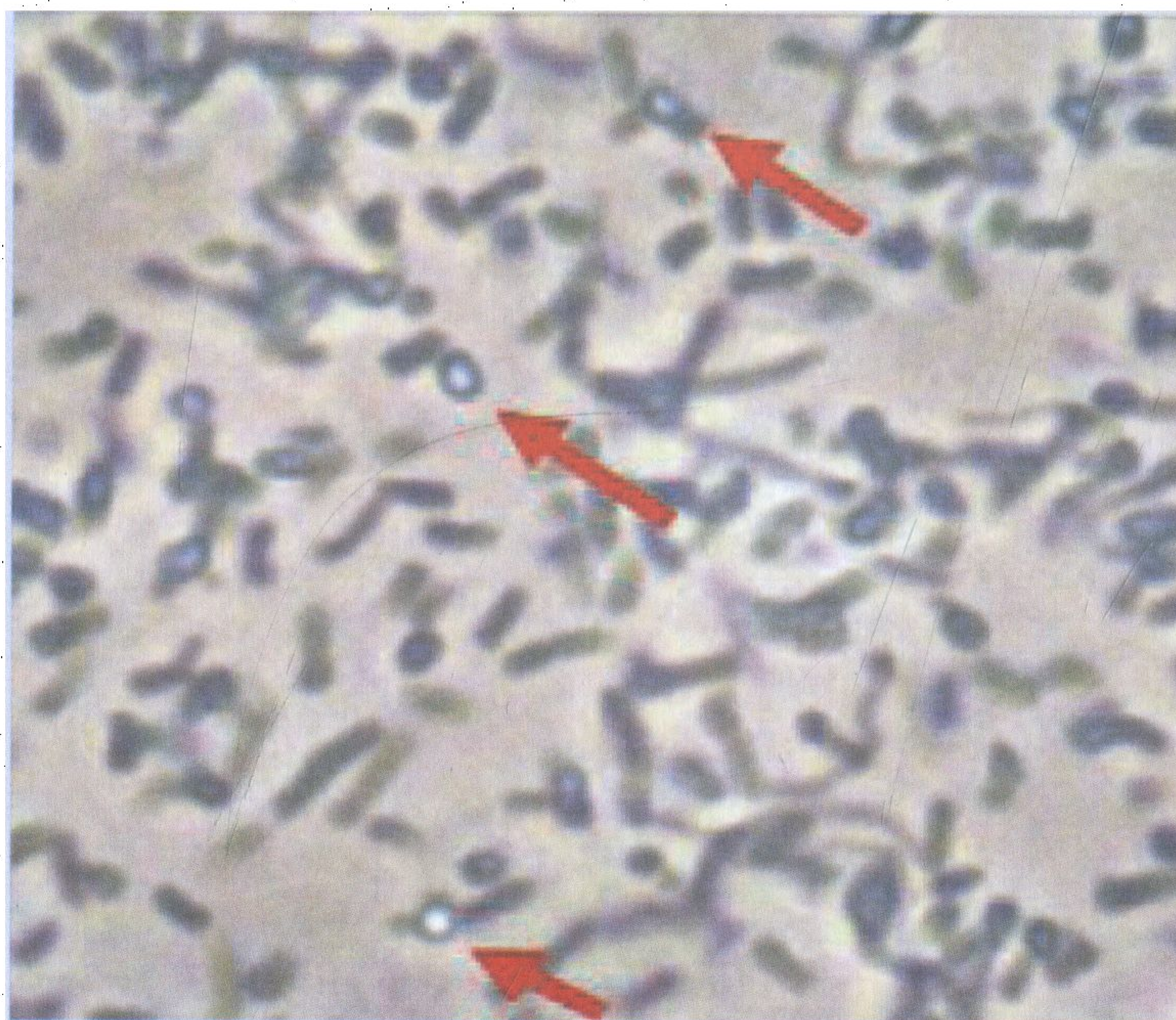
بكتيريا Rhizobium
http:www.cetiom.fr



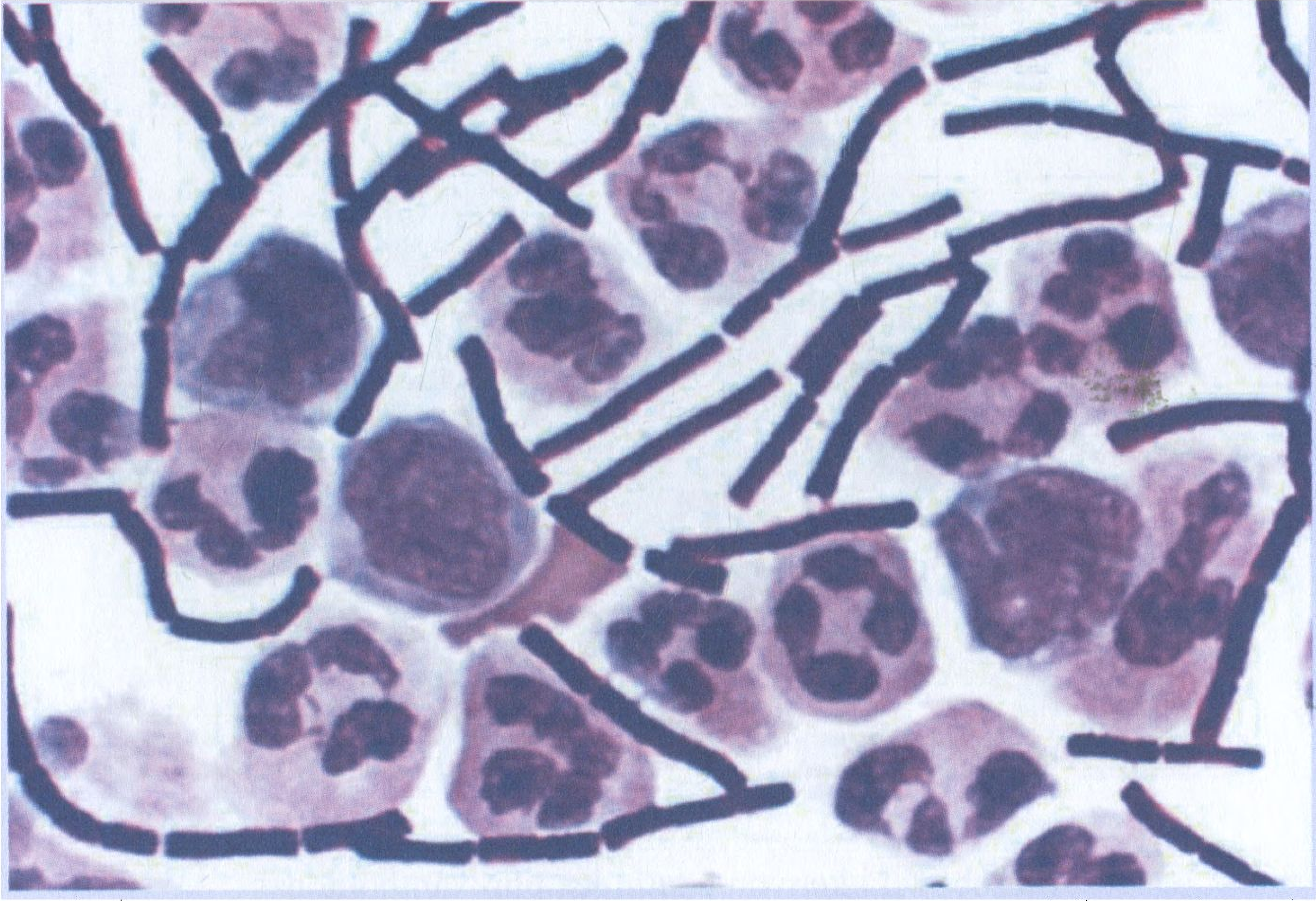
شكل مستعمرات بكتيريا Xanthomonas على طبق الاجار
www.pnas.org



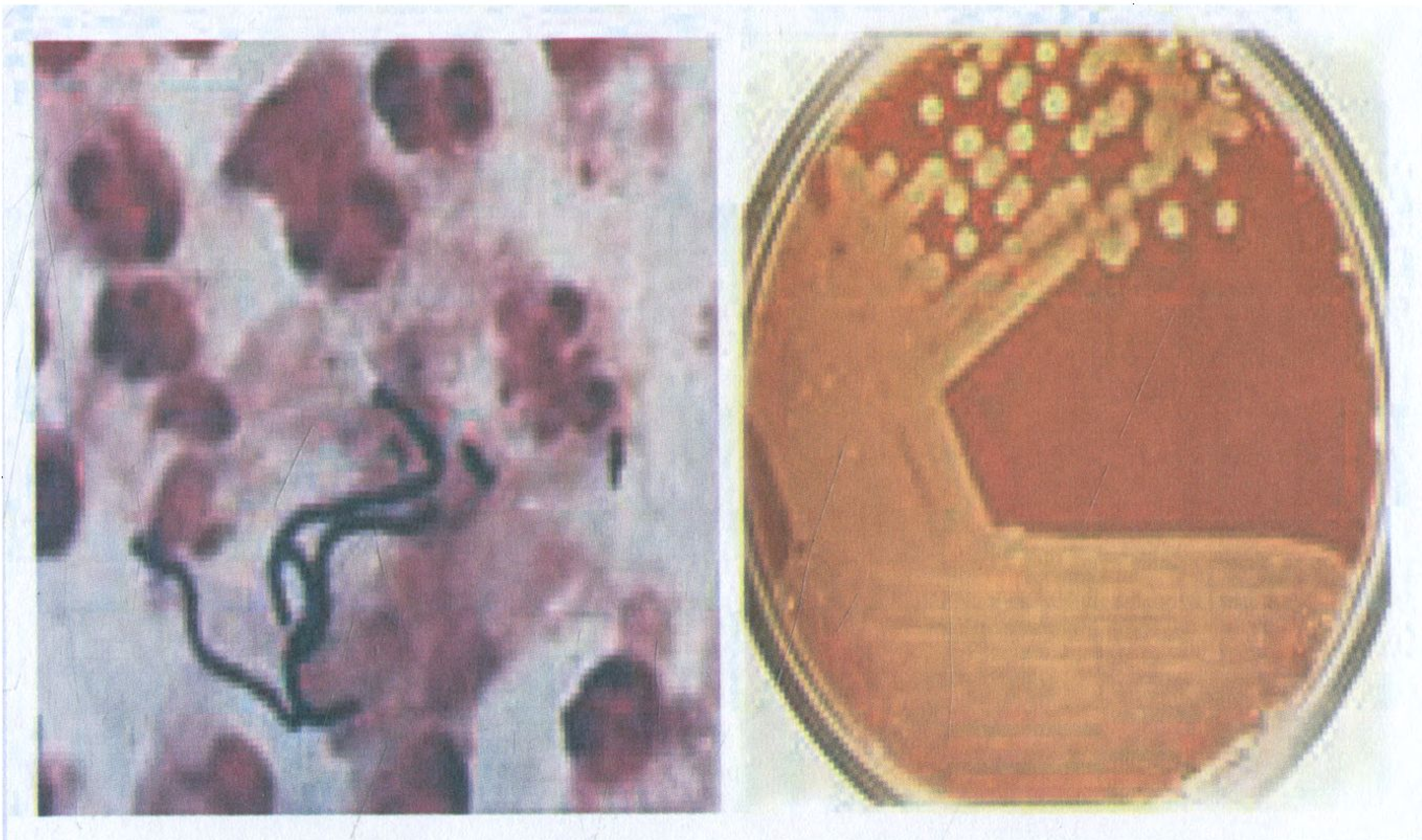
بكتيريا Xanthomonas الممرضة للنبات
Microbewiki.kenyon.edu/index.php/xanthomonas



سبورات Streptomyces المرضية للنبات
www.ncppb.com

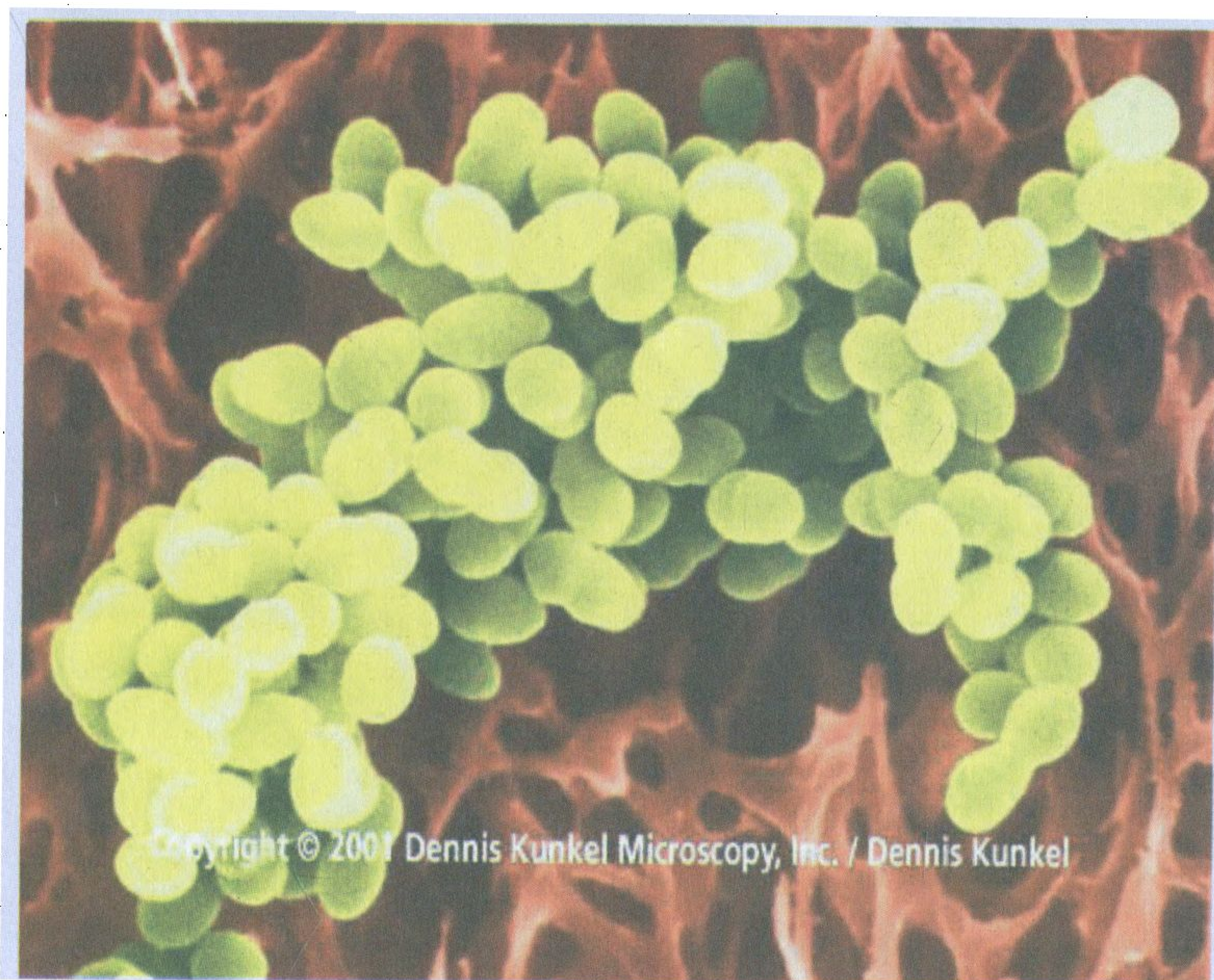


عصيات بكتيريا الجمرة الخبيثة Bacillus anthracis الموجبة لجرام
Bacteriology.suite 101.com

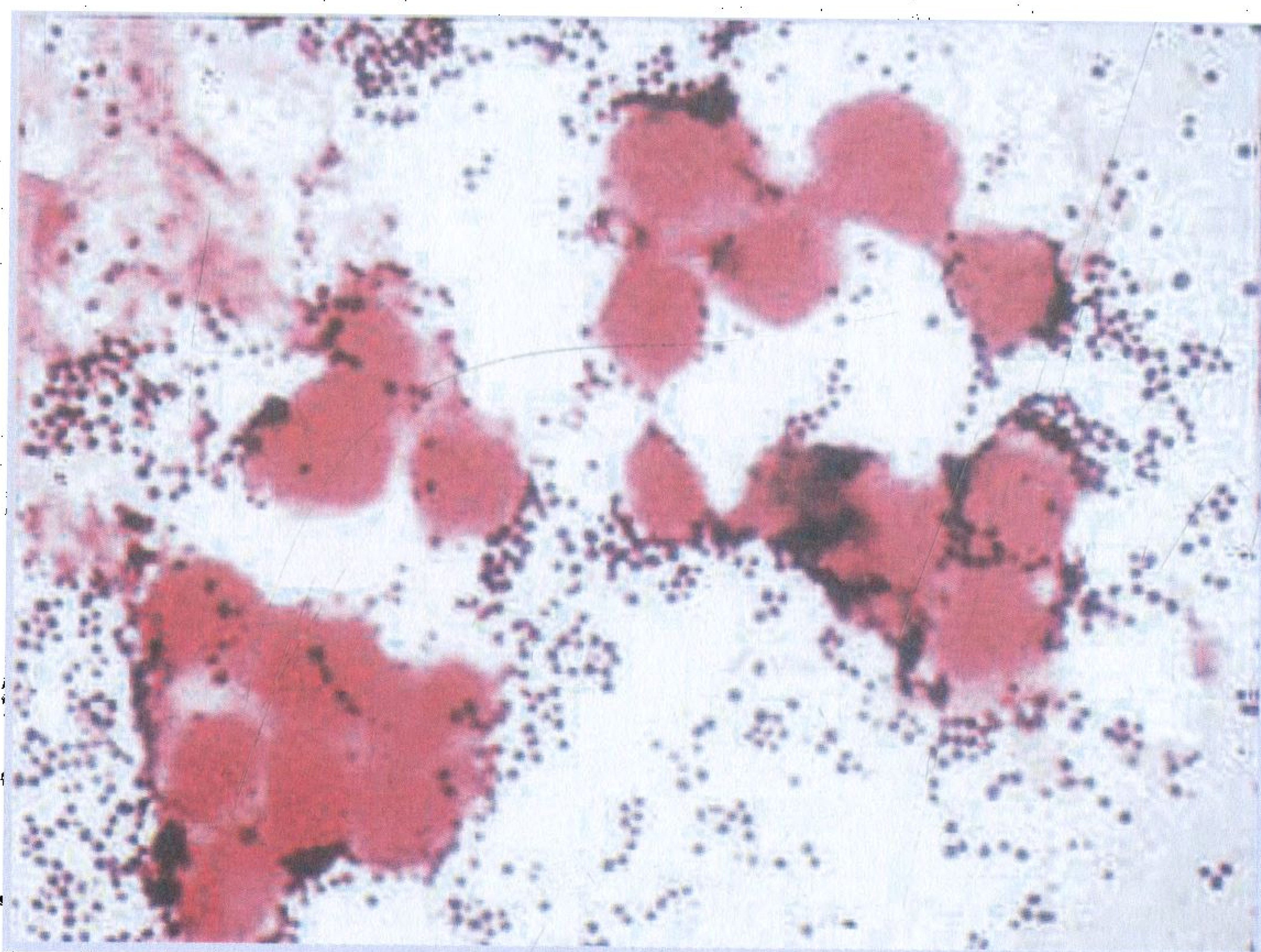


تحلل B على طبق اجار الدم عصيات موجبة لجرام المكورات المسبحية Streptococcus

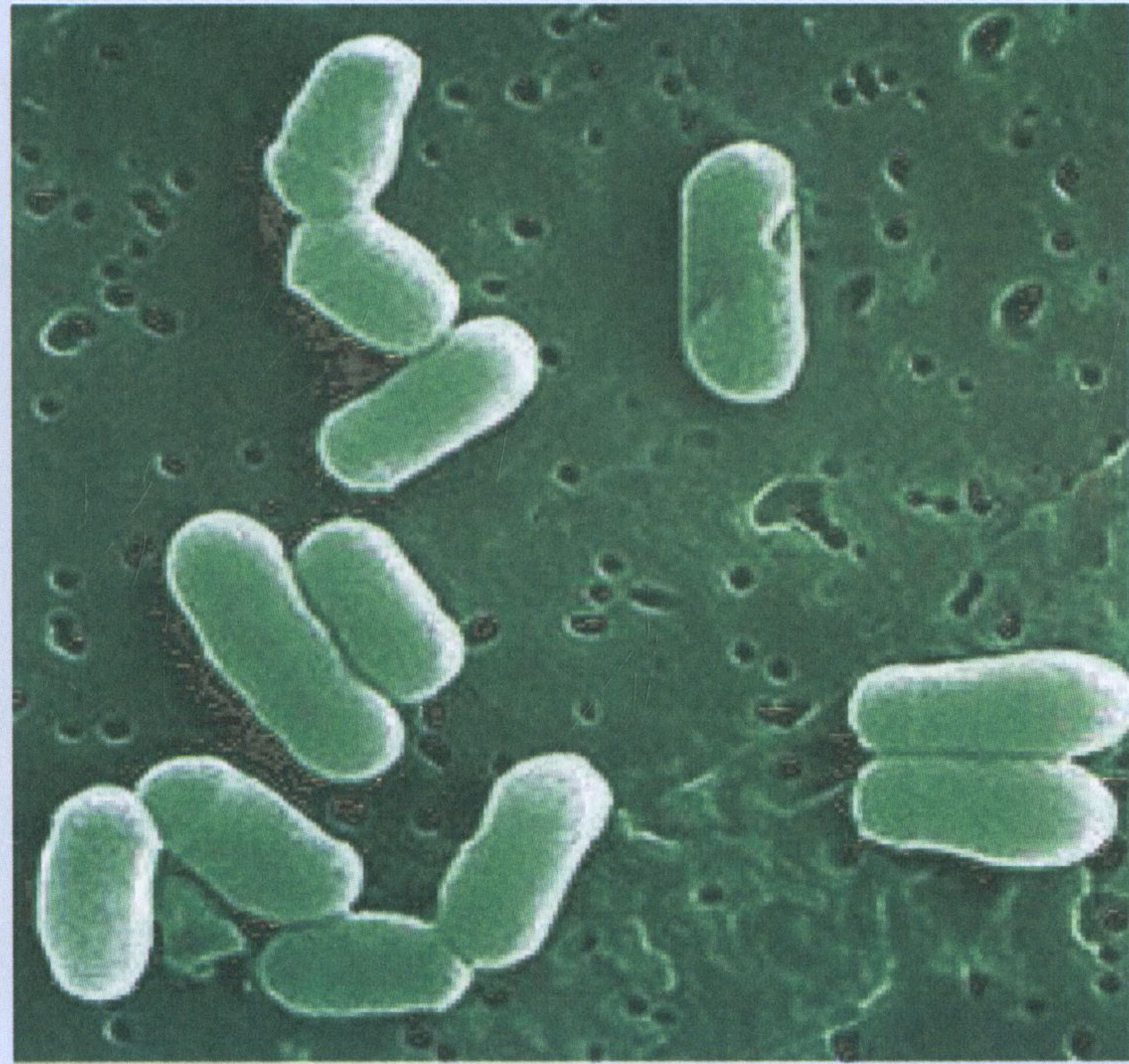
(Todar , 2005)



التجمعات العنقودية لبكتيريا Staphylococcus aureus
Student.ccbmd.edu



بكتيريا Staphylococcus الموجبة لكرام
(Todar,2008)

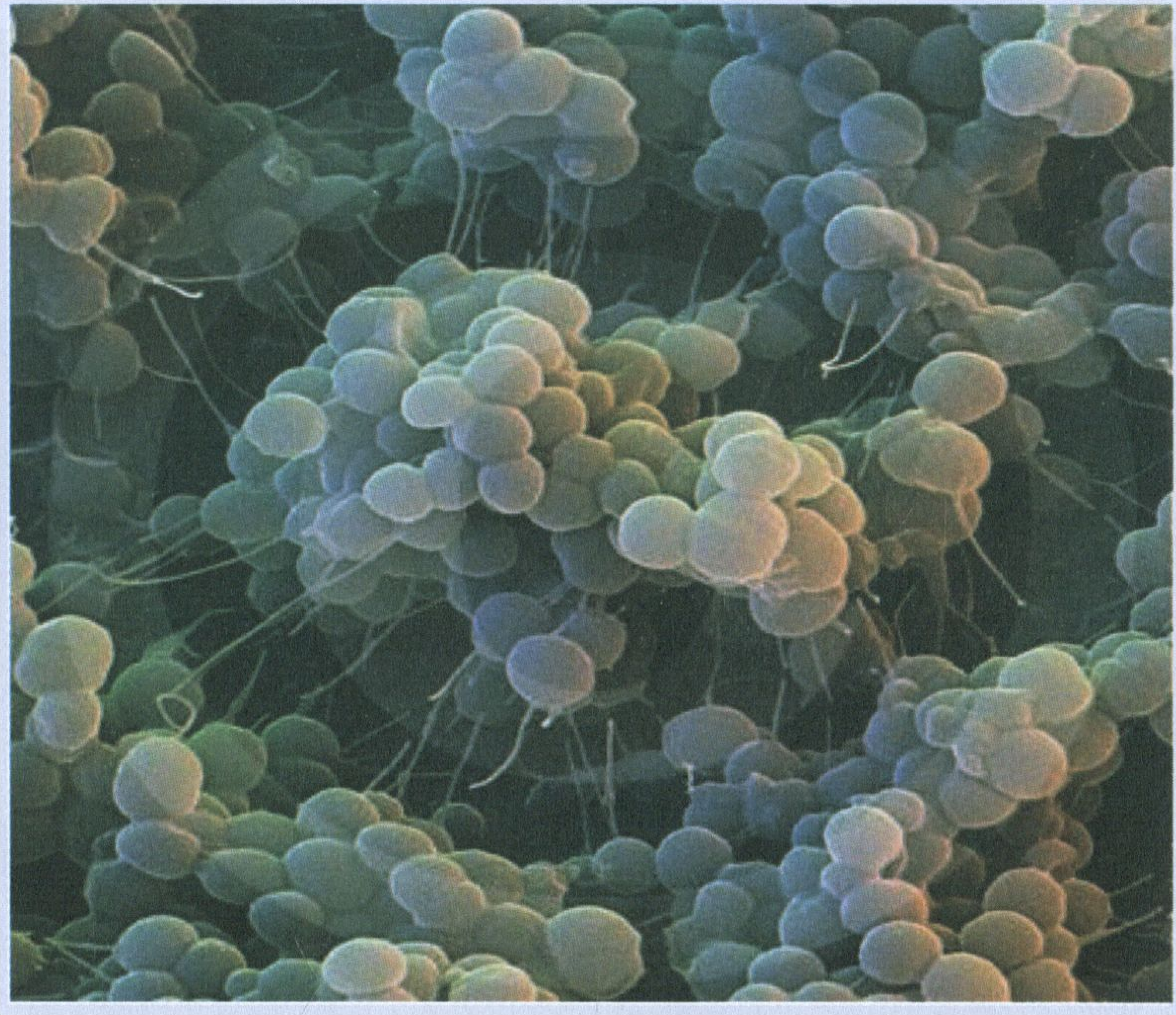


عصيات وتجمعات بكتيريا Corynebacterium diphtheriae
Microbiology btyes .wordpress.com

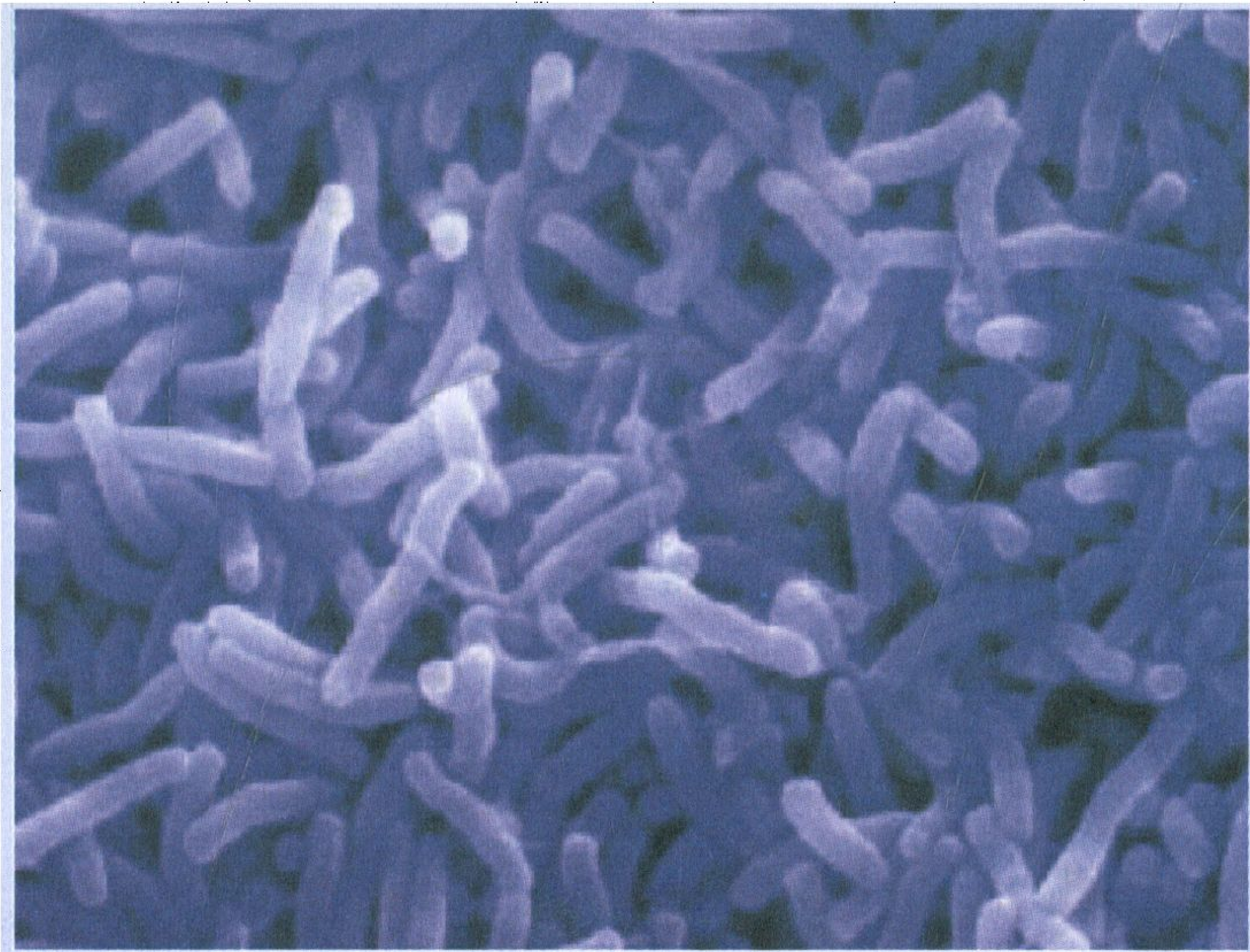


عصيات بكتيريا Clostridium botulinum الموجبة لكرام لاحظ موقع السبورات
bioinfo.bact.wisc.edu

1



بكتيريا Staphylococcus
Faculty.ksu.edu.sa



شكل ضمات الكوليرا حسب مشاهدتها تحت المجهر الالكترونى
Letsgoeverywhere.wordpress.com



Salmonella enteritidis

الفصل الثاني

2 السموم البكتيرية المؤثرة على النباتات

Bacterial Toxins Effect in Plant Diseases

1. مقدمة Introduction

عرفت السموم بكونها العوامل المهمة المسببة لنشوء عدد من الأمراض المهلكة للنباتات. مثال ذلك السموم (Toxins) المنتجة من قبل بكتيريا جنس السودوموناس Pseudomonas والتي تشترك في أمراض فول الصويا، الفاصولياء، نبات التبغ، الفواكه الصخرية والمحاصيل الأخرى. وهناك العديد من السموم المنتجة من قبل الفطريات والتي تسبب الهلاك لنباتات الذرة والرز والمحاصيل الغذائية الأساسية الأخرى. وبالتالي تحدث كوارث اقتصادية، وهذا ما حدث عام 1970 - 1971 في أمريكا، نتيجة لإصابة نباتات الذرة بمرض آفة لفحة الأوراق الذي يدعى ب Southern Leaf Blight المسبب عن جنس Helminthosporium ، حيث سبب الفطر خلال هذه السنة خسارة اقتصادية تفوق الخسارة المسببة عن أمراض النباتات والآفات الزراعية خلال التاريخ كله.

ويهتم الباحثون في السموم لأسباب أخرى منها على سبيل المثال في علم أمراض النبات هو لمعرفة الأسس الجزئية (Molecular basis) لنشوء المرض ومقاومة المرض في النباتات. ولحد الآن تعتبر هذه مسألة صعبة ومعقدة جداً. إلا أن التقدم في هذا المجال يمكن ان يتم من خلال تجزئة المشكلة إلى مكوناتٍ أصغر أو بالأسئلة التي يسهل حلها. مثلاً كيف نُفسر المرضية (Pathogenicity)، مقدار حِدّة (شِّدة) المرض (Virulence) وكيفية اختيار الكائن المجهري للمضيف.

بصورة عامة نحن جميعاً نتفق بأن هناك أسس كيميائية لكل هذه الظواهر، تشمل مقاومة المرض، ولكن هناك اعتبارات أخرى تُظهر اختلافات في الرأي.

في بعض الحالات، يكون تحرير السم (Toxin) من قبل الكائن الحي الجهري الممرض (Pathogen) بمثابة مفتاح لفهم المرضية، حدة المرض وحتى اختياره للمضيف. إلا أن هناك العديد من الأمراض النباتية المعدية (Infectious) لا ينطبق عليها ما تقدم بالنسبة لتحرير السم.

وقد تعتمد المرضية أما على تحرير مواد خاصة من قبل الكائن الممرض أو تعتمد على التركيب الكيميائي المرتبط بسطح الخلايا. ومع هذا فإن كل الدراسات المحددة والدقيقة، تشمل السموم المنتجة من قبل الكائنات الممرضة (Scheffer & Briggs , 1981).

وقد تم تشخيص العديد من التقنيات التي بواسطتها يمكن للكائنات الجهرية أن تغير من خلايا المضيف وتحفز المرض. وعموماً فإن التقنيات المقبولة منها يمكن ان تصنف إلى ما يلي :

أ- إنتاج أو تحرير مواد تتداخل مع الفعاليات الأيضية (Metabolism) أو تُغيرُ من التركيب الاعتيادي للبروتوبلازم.

ب- إنتاج أو تحرير مواد تتداخل مع السيطرة الطبيعية للنمو والتطور (مثل أشباه الهرمونات، مضادات الهرمونات ومواد أخرى).

ج- إنتاج أو تحرير الأنزيمات التي تعمل على تكسير أو تحطيم جدار الخلايا.

د- التداخل مع الحركة الطبيعية للماء، المواد المغذية ونواتج الفعاليات الايضية (Metabolism) .

وتشتمل الفقرة (أ) السموم التقليدية المسببة لإصابات النباتات واعتيادياً تكون ذوات أوزان جزئية قليلة.

2. تعريف السموم في علم أمراض النبـــات
Pathology Definition Of Toxins in Plant

لقد استخدمت كلمة السم في معانٍ مختلفة وان تعريف السُم في علم أمراض النبات يختلف عن ذلك المستخدم في الطب (Pringle & Scheffer, 1964).

وفي علم أمراض النبات يعتبر الـسم ناتجاً ميكروبيـاً، باسـتثناء الأنزيمـات، والذي يسبب تلف واضح لأنسجة النبات، كما يعرف بثقة معقولة بأنه يـؤثر في نشوء المرض.

إن استثناء الأنزيمات من هذا التعريف يـصعب تبريـره، وذلـك لان بعـض الأنزيمات من الكائنات الممرضة للنباتات تشترك، بوضوح، في تحطـيم الأنـسجة وعلية فهي سمية للخلايا النباتية (Bateman&Basham,1976).

في المراجع العلمية نجد مصطلح السم النباتي (Phytotoxin) والـذي يُعـرف بكونه أي مادة سامة للنباتات على الرغم مـن أن المـصطلح قـد يـشير إلى المـواد السامة المنتجة من النباتات. المصطلح سم نباتي ينطبق على السموم المنتجـة مـن قبل الأحياء المجهرية والتي تكون سُـمية للنباتـات إلاّ أنهـا لا تعتـبر ذات أهميـة أساسية أثناء عملية نشوء المرض (Pathogenesis)، (Luke & Gracen, 1972).

أن تعريف المصطلح سم نباتي ليس منطقياً إطلاقا كما يمكن أن ينتج عنه سـوء فهم. أولا، ليس من الواضح لِمَ لا يعتبر السم النباتي ذا أهمية رئيـسية أثنـاء نـشوء المرض. ثانياً، السم النباتي ممكن ان يُساء فهمه على انه سم مُنتج من قبـل النباتـات العليا. لهذا السبب فإن مصطلح سم نباتي قد أُبدل بمصطلح سـم (Toxin) فقـط أو مركـب سـام للنبـات Phytotoxic Compound (Rudolph, 1976). هنـاك مصطلح آخر هو السم الممرض للنبات (Pathotoxin) ويستخدم للسموم التي تكون المحدِّد أو المقرِّر الرئيسي للمرض وللمرضية (Wheeler & Luke, 1963).

الفيفوتوكسن Vivotoxin قد عُرف على انه المادة المنتجة في المضيف المصاب، من قبل الكائن المرض أو مضيفهُ، ويعمل على إنتاج المرض، إلا انه ليس هو العامل المحرض الأولي في المرض (Diamond & Waggoner, 1953)، والمصطلحان الأخيران غير مقبولين على نطاق واسع (انظر 3-4).

في الطب يعرف السم بأنه ذلك الصنف الخاص من السموم Poisons التي تختلف عن السيانيد مثلاً، أو الزئبق بأصلها الميكروبي، تركيبها البروتيني، أوزانها الجزئية العالية وقابليتها على توليد الأضداد (الأجسام المضادة) عند حقنها في الجسم. إلا أن هذا التعريف مُقيد لأنه يستثني المركبات السمية غير البروتينية مثل السموم الداخلية Endotoxin (Bonventre,1970) (راجع الفصل الثامن، التاسع والعاشر).

عموماً فإن أجناس البكتيريا من نوع الموجبة لكرام كالـStreptococcus ، Clostridium والـ Staphylococcus تنتج العديد من السموم المحللة للخلايا (Cytolytic Toxin) والتي تظهر بأنها تعمل أنزيميا (Stanier et al., 1977). البكتيريا من نوع السالبة لكرام كالـPseudomonas aeruginosa تكون مركبات سُمية خارج الخلية (Toxic extracellular products)، وتشمل الفوسفولايبيز Phospholipase، كولاجينيز Collagenase، لايبيز Lipase، الهيمولايسين Haemolysin، والسم المعوي Enterotoxin .

سم الدفتريا DiphteriaToxin المنتج بواسطة بكتيريا Corynebacterium diphtheria هو مثال على السم، الذي يعمل انزيمياً (Stephen & Pietrowski, 1981).

في الختام فإن أفضل تعريف لمصطلح السم هو ناتج ميكروبي يسبب ذلك التلف أو الضرر الواضح لأنسجة النبات بتركيز معقول والذي يُعرف، بالتأكيد مسبباً في نشوء أو توليد المرض.

إن الفكرة السائدة، عن السموم بكونها تلعب دور العامل المسبب في معظم

ان لم تكن في كل أمراض النبات المسببة عن الفطريات والبكتيريا، جَذّابة وتعود إلى زمن علماء أمراض النبات مثل Debary، Ward و Kahn.

2

3. تصنيف السموم في علم أمراض النبات
Classification Of Toxins in Plant Pathology

أ- التركيب الكيماوي Chemical Structure. احد الأنظمة التصنيفية الواضحة للسموم هو الذي يعتمد على تركيبها الكيماوي (Stoessl,1981; Kono Et al.,1981; Ballio,1981)، ويشمل الببتيدات (Peptides)، الجليكوبروتين(Glycoproteins) السكريات المتعددة (Polysaccharides)، الأحماض العضوية (Organic Acids) الأحماض الدهنية (Fatty Acids) ومشتقاتها، بولي كيتايد (Polyketides) أو التربينات (Terpenoids). ونظراً لكون نسبة قليلة من التراكيب الكيماوية معروفة لسموم لها دور لا غبار عليه في المرض، لذلك، فإن التصنيف الذي يعتمد على التركيب الكيماوي له استخدامات محدودة.

ب- الكائن المنتج Producing Organism. هناك تصنيف بيّن يعتمد على نوع الكائن الحي المنتج للسم (مثال ذلك الفطريات أو البكتيريا).

جـ- النشاط البيولوجي Biological Activity. بعض المخططات التصنيفية للسموم تعتمد على النشاط البيولوجي، مثال: مثبطات الأنزيمات (Enzyme Inhibitors)، مضادات نواتج الأنشطة الايضية (Antimetabolites)، والمركبات المؤثرة على الأغشية (Membrane affecting Compounds)، (Daly, 1981).

د- خصوصية الإصابة للمضيف Host Specificity. تصنف السموم إلى، السموم التي تصيب مضيف معين خاص (Host Specific Toxin)

(Scheffer,1976) وإلى السموم التي ليس لها مضيف خاص لإصابته (Nonhost Specific toxin) (Rudolph, 1976) والسموم التي تصيب مضيفاً معيناً تكون فعاله ضد المضيف الخاص للكائن الحي المنتج لها، ولها تأثير قليل أو عديمة التأثير ضد النبات الذي لا يمثل مضيف الكائن الحي المنتج لها . بينما السموم الغير الخاصة لإصابة مضيف معين تكون نشطة ضد النبات المضيف وغير المضيف للكائن الحي المنتج لها.

هـ- دور السم في نشوء المرض Role of Toxin In Pathogenesis. هناك نظام أخر لتصنيف السموم يعتمد على تقسيمها إلى عوامل محدِّدة (مقرِّرة) أولية (Primary determinants) وإلى عوامل محددة ثانوية (Secondary determinants) للمرض(Scheffer & Pringle, 1976). والعوامل المحدِّدة الأولية تُعرف على أنها عوامل أساسية وضرورية للكائن الممرض لكي يَستعمر المضيف ولنشوء المرض، بينما العوامل المحددة الثانوية تعزى إليها بعض أعراض المرض أو تساهم في أظهار حِدَّة المرض، ولا تعتبر أساسية للكائن الممرض لاستعمار المضيف. هذان المصطلحان غير مفيدين أو مقبولين (انظر الفصل السادس).

و- دور السم في المرض Role of Toxin In Disease. يعتمد هذا التصنيف على تعريف السمية (Toxigenicity قابلية توليد السموم) هي على الأقل المحدد الجزئي للمرضية(Turner, 1984).

ففي بعض الحالات تلعب السُمية دوراً حاسماً في التعبير عن المرضية. مثال

ذلك، توكسين الفكتورين (Victorin*) والذي يصيب مضيفاً خاصاً. هو مثال للسم الذي يكون العامل المحدد الوحيد للتعبير عن المرضية كما انه قادر على ان يولد كافة الأعراض المرئية والتغيرات البايوكيمياوية للمرض المسبب من فطر Helminthosporium Victoriae . الفكتورين يُحدث هذه التأثيرات في نبات 2
الشوفان (الهرطمان Oat) المعرض للإصابة (Susceptible) بفطر H. victoriae فقط (Daly, 1976). إضافة إلى هذا فإن إصابة نبات الشوفان المعرض للإصابة، بأنواع غير ممرضة لفطر Helminthosporium Victoriae يمكن تحقيقه بواسطة تجهيز النسيج المعرض للإصابة بسم الفكتورين (Yoder & Scheffer, 1969). كل العزلات المنتجة للفكتورين تكون ممرضة لنبات الشوفان الحاوي على جين (Gene) التعرض للإصابة، وكل العزلات الغير منتجة للفكتورين تكون غير ممرضة للشوفان (Scheffer, 1976) وعليه فإن الفكتورين هو المحدد الوحيد للأمراضية.

الفيزيولوتوكسين (Phaseolotoxin) ليس له مضيف خاص لإصابته، ويعتبر المحدد الجزئي للأمراضية وذلك لان طفرة لبكتيريا Pseudomonas Phaseolicola غير مولدة للسم (Phaseolotoxin) تبقى معدية (Infectious) للنبات وتسبب تكوين بقع موت موضعي (necrotic spots) في نسيج الورقة، دون ان تسبب هالات (Halos) صفراء أو اصفرار نظامي، شحوب يخضوري جهازي (Systemic Chlorosis) في النبات (Patil et al., 1974) ان هذا التفسير يختلف عن تفسير Yoder (1980) حيث اقترح بأن الفيزيولوتوكسين هو عامل الحدة المرضية في المرض. على أية حال فإن حدة المرض تشير إلى المفاهيم أو الهيئة

* على الرغم من إن سم، الفكتورين، منتج من قبل الفطر الـHelminthosporium Victoriae إلاّ انه يعتبر أحسن مثال في علم أمراض النبات لتوضيح مفهوم دور سم في المرض.

الكمية (Quantitative aspects) لقابلية الكائن الممـرض في تـسبب المـرض وقـد نوقشت هذه، بالنسبة الفيزيولوتوكسين، من قبل Turner (1984) على ان المرض المسبب عن العزلة المنتجة للتوكسين والطفرة الغير المنتجة له يختلفان نوعياً.

ز- الأعراض المُستَحثة Induced Symptoms.

يعتمد هذا التصنيف على الأعراض المُستحثة بواسـطة الـسم. مثـال ذلـك التابتوكسين (Tabtoxin) والفيزيولوتوكسين يُسببان نوعاً متميزاً مـن الاصفـرار والـذي هـو الصفـة المميزة للنبات المريض طبيعياً(Patil et al., 1974).

وهناك الموت الموضعي لنسيج (Necrosis) المسبب على سـبيل المثـال مـن، سم سرينجومايسن (Syringomycin) حيث يقع تـأثيره علـى الأغـشية الخلويـة (Backman & DeVay, 1971).

الـسمـوم المـسببة للـذبول (Wilting) مثالهـا أميلوفـورين (Amylovorin) يسبب أعراض الذبول، مرض لفحـة النـار لمعظـم عائلـة Rosaceae (Sjulin & Beer, 1978).

4. أثبات دور السم في المرض Proof Of Role Of Toxin In Disease

لبرهنة دور السم في المرض، استخدمت عدة مقاييس أو معايير لإثبات ذلك (Rudolph, 1976).

أ- عزل السم من الكائن المجهري المنتج له

Isolation of toxin from producing microorganism.

السم المنتج في مـزروع (Culture) ممكـن أن يـسبب الأعـراض المرضـية في المضيف (النبات). إلاّ ان هذا الدليل يجب ان يُدرس بحـذر، لأنـه خـلال الحالـة

الطبيعية لنشوء المرض، قلما يعمل السم لوحده وإنما يعمل بالاشتراك مع نـواتج الكائن الممرض الأخرى (نواتج الأنشطة الايضية والأنزيمات).

ولهذا السبب فإن أنتاج الأعراض النموذجية للمـرض ينبغـي عـدم توقعـه
بواسطة السم لمفرده وحتى في حالة إخفاق ظهور الأعراض المرئية بواسطة السم 2
النقي فهو ليس سبباً حيوياً لأبعاد السم كعامل مـساهـم (Contributing factor)
في نشوء المرض.

كذلك هناك عائق آخر في هذا الدليل أو البرهـان، هـو ان بعـض الـسموم يستحصل عليها من النبـات المـصاب فقـط كـسم P. Syringae Pv.phaseolicola (Delgado, 1974) وسـم بكتريـا Erwinia amylovora (Goodman et al., 1974) ان الفشل في الحصول على علاقة طردية بين مستوى (Level) السم المنتج خارج الجسم الحي in vitro ومرضية العزلة البكتيرية في النبات داخل الجسم الحـي in vivo قد يعزى إلى ان الظروف المتوفرة في جسم النبات لا يمكن توفيرها بـسهولة في الوسط المغذي لإنتاج السم، كذلك فإن ديناميكيـة علاقـة الطفيـل بالمـضيف (Host-Parasite relationship) قد ينتج عنها بناء مستوى عـالٍ مـن الـسم علـى الرغم من عدم الحصول على سم منتج من الكائن الممرض خارج الجسم الحـي (النبات).

ب- عزل السم من النبات Isolation Of Toxin From Plant.

ان عزل السم من النبات المريض من الأمور الصعبة جداً بسبب (1) عـدم ثبـوت السموم، (2) الجرعات المؤثرة منخفـضة جـداً، (3) الارتبـاط الغـير عكـسي للـسم في مكان فعله، لذلك لا يمكن تحريره من مكان ارتباطه بدون تحطيمه. وعليه فقد اقترحـت طرق أخرى، مثل، تعلـيم الكـائن الممـرض بالنظـائر المـشعة (Radioisotopes) الملائمـة (Wheeler, 1953) لغرض إنتاج سُم مُعَلَّم داخـل جـسم النبـات In Vivo . إلاّ ان هـذه

الطريقة لم تستخدم بنجاح (Rudolph, 1976). وقد استخدمت كـذلك الطـرق المـصلية (serological methods) . (Rai &Strobel,1969) وهنـاك إمكانيـة أخـرى هـي إثبـات الفعل الخاص للسم في داخل الجسم الحي، مثال ذلـك، تـراكم الاورنـثين (Ornithine) المستحدث بواسطة سم P. phaseolicola(Rudolph & Stahmann, 1966).

جـ- استخدام طفرة غير مولدة للسم Use Of Tox⁻ Mutant.

استخدمت الطفرات الغير مولدة للسم في تجارب معتمدة على أساس هـو، إذا كان السم المنتج في المرض يسبب تلك الأعراض المميزة فإن استخدام طفـرات غـير مولدة للسم يجب إن لا يحدث تلك الأعراض (Turner, 1984)، مثل، الطفرات غير مولدة لسم لبكتيريا P. syringae pv. Phaseolicola (Patil et al., 1974).

د- تثبيط فعل د أو إنتاج السم داخل الجسم الحي (النبات).

Inhibition action or production of toxin in vivo.

الدلائل عن دور السم خلال عملية نشوء المـرض يمكـن أن يحـصل عليـه، عندما يثبط نشاطه بواسطة مضادات السموم (Antidotes) أو استخدام حـالات بيئية خاصة. تأثير سم النفثازارين (Naphthazarine) يمكـن ان يبطـل باسـتخدام ايونات المعادن الثقيلة، كذلك فإن نشوء المرض يمكن ان يبطئ باستخدام أمـلاح النحاس Cu والألمنيوم Al .

إن درجة الحرارة المثلى لنشوء المرض وتكوين الهالات الصفراء بواسطة الـ P. Syringae pv. phaseolicola هي حوالي 20 درجـة مئويـة، ودرجـة الحـرارة المثلـى لإنتاج السم خارج الجسم الحي هـي أيضا 20 درجـة مئوية (Hoitink et al., 1966)،

عليه فإن المرض ينشأ بدرجة حرارة تسمح لإنتاج فيزيولوتوكسين (Rowley et al., 2000).

2

5. أهم الصعوبات في بحوث السموم
Major Problems In Toxins Researches

في السابق كانت أهم مشكلة بالنسبة لبحوث السموم هي الافتراض السائد بان أي ناتج أيضي سُمي يعتبر بذاته عامل مسبب في المرض. وهناك أمثلة توضح بان هذا الافتراض غير سليم. ولحد الآن فإن المصادر العلمية الحديثة لا تزال تظهر هذا الحمل الثقيل في محتوياتها. إلا أن الباحثين العلميين يجب ان يصروا على بعض الشواهد المعقولة والتي لها دور مسبب في المرض قبل قبول أي صيغة مفترضة للسم أو قبوله للنشر. ان هذا يتطلب محاولات كبيرة وذلك لان إثبات دور السم في المرض يمكن اعتباره أصعب خطوة في بحث السم. وحالما يثبت دليل على دوره المسبب في المرض فإن المشاكل المشتركة الأخرى، في عزل السم هي نفس المشاكل التي يواجهها الباحثون في عزل النواتج الطبيعية عموماً.

إن دراسات حول طريقة عمل السموم تجلب مشاكل مختلفة، مألوفة للكيميائيين الحياتيين.وإن تقييم أو تحليل أي مادة طبيعية تعتبر خطوة لاحقة بعد عزلها.

إن أهمية إيجاد طريقة تقييم جيدة للسم لا يمكن أن يغالي في توكيدها، وان تطوير طرق التقييم تستحق محاولات وتجارب كثيرة. هناك أمثلة عديدة عن أعمال في السموم مشكوك فيها بسبب عدم استخدام وسيلة تقييم ملائمة ووافية بالغرض.

بعض طرق التقييم الشائعة يجب إن تستخدم بحذر لعدة أسباب. فالتقييم المعتمد على امتصاص محلول السم بواسطة قطع في الساق ممكن ان يؤدي إلى تضليل وخداع الباحث. ويجب اخذ الاحتياط الكافي لعمل قطع يمتص كمية معلومة من محلول السم، لان القطع يرشح باستمرار المحلول مؤدي إلى تركيز

السم في النسيج. مـواد عديـدة ذات أوزان جزئيـة عاليـة كالكاربوهيـدرات، في راشح المزروع تسبب ذبول بسبب غلق أوعية الخشب في القطـع المعمـول وهـذه ممكن ان تؤدي إلى نتائج خاطئة أيضا. حتى الاصفرار وموت النـسيج الموضـعي في جزء الساق المقطوع يؤدي إلى خداع الباحـث لان عـدداً كـبيراً مـن الـسموم تعطي هذه الأعراض، كما أن وجود تركيز عالي من مواد مختلفة ممكن أن تلغـي تأثير المركب المعين ذي الأهمية المطلوبة.

إن استخدام التقييمات الكيميائية تعتبر مثالية لغرض تقيـيم الـسم إلا أنهـا تكون غير متوفرة لحين إثبات التركيـب الكيميـائي للـسم ويعـرف الـسم أصـلا بواسطة الاختبار الإحيائي (Bioassay) لحين إثبـات التركيـب الكيميـائي وعليـه فإن الاختبار الإحيائي هو المبدأ المعتمد في الاختبار لذلك يجب ان يحفظ ويصان.

وأخيرا فهناك سؤال آخر، ما هـو دور الـسم للكـائن الحـي المنـتج لـه. أن السؤال هنا هل أن السم هـو لغـرض تمكـين الكـائن الممـرض مـن أن يـستعمر المضيف أم انه لغرض إدامة تنافس الكائن الممرض مع بقية الكائنات المجهريـة في الطبيعة. يبقى أن نسأل هل أن الكائن الحي عندما يفقد قابليته على تكوين السم يصبح حساساً له وبالتالي يتأثر به كبقية الأحياء الأخرى.

6. التوقعات والتخمينات
Prospects and Speculations

تشخيص عدد كبير من السموم يجب إن يسير الآن بسرعة لتوفر الأجهزة 2
الحديثة في التحليل مثل:

(Mass Spectroscopyو Nuclear Magnetic Resonance,)

توفر معلومات حول تركيب عدد آخر من السموم يجب ان تؤدي إلى تبصر أعمق في علاقة السمية بالتركيب وتسهل عملية تصنيف السموم بطرق عملية مفيدة.

إثبات دور عدد كبير من السموم في المرض يجب أن يأتي تدريجياً، وكلما أصبح الباحثون أكثر معرفة بأهمية هذه الخطوة.

اعتبر فهم فعل السم، هدفاً محيراً بالنسبة للباحثين في السموم والمواد الفعالة بيولوجياً. إن المساهمة في هذا المجال يجب أن تستمر ويجب إجراء التطبيقات التقنية الفيزيائية المعروفة واستخدام الأجهزة المتطورة الجديدة وزيادة تفهم الخلية بيولوجياً.

ما هي الإمكانيات أو الاحتمالات للتطبيقات العلمية المفيدة من معلوماتنا حول السموم المؤثرة على النباتات؟ حتى الآن، استخدمت السموم التي تصيب مضيفاً معيناً في أنظمة التربية والتكاثر النباتية وللفحص عن المقاومة للمرض. وان الفهم الكافي لإمراض النبات سيقود إلى تطبيقات مفيدة في الإنتاج النباتي.

فيما يلي بعض الصور التي توضح التلف والضرر الواضح على أنسجة النباتات الناتج عن السموم البكتيرية.



شكل (1) حقل مصاب بآفة لفحة الأوراق

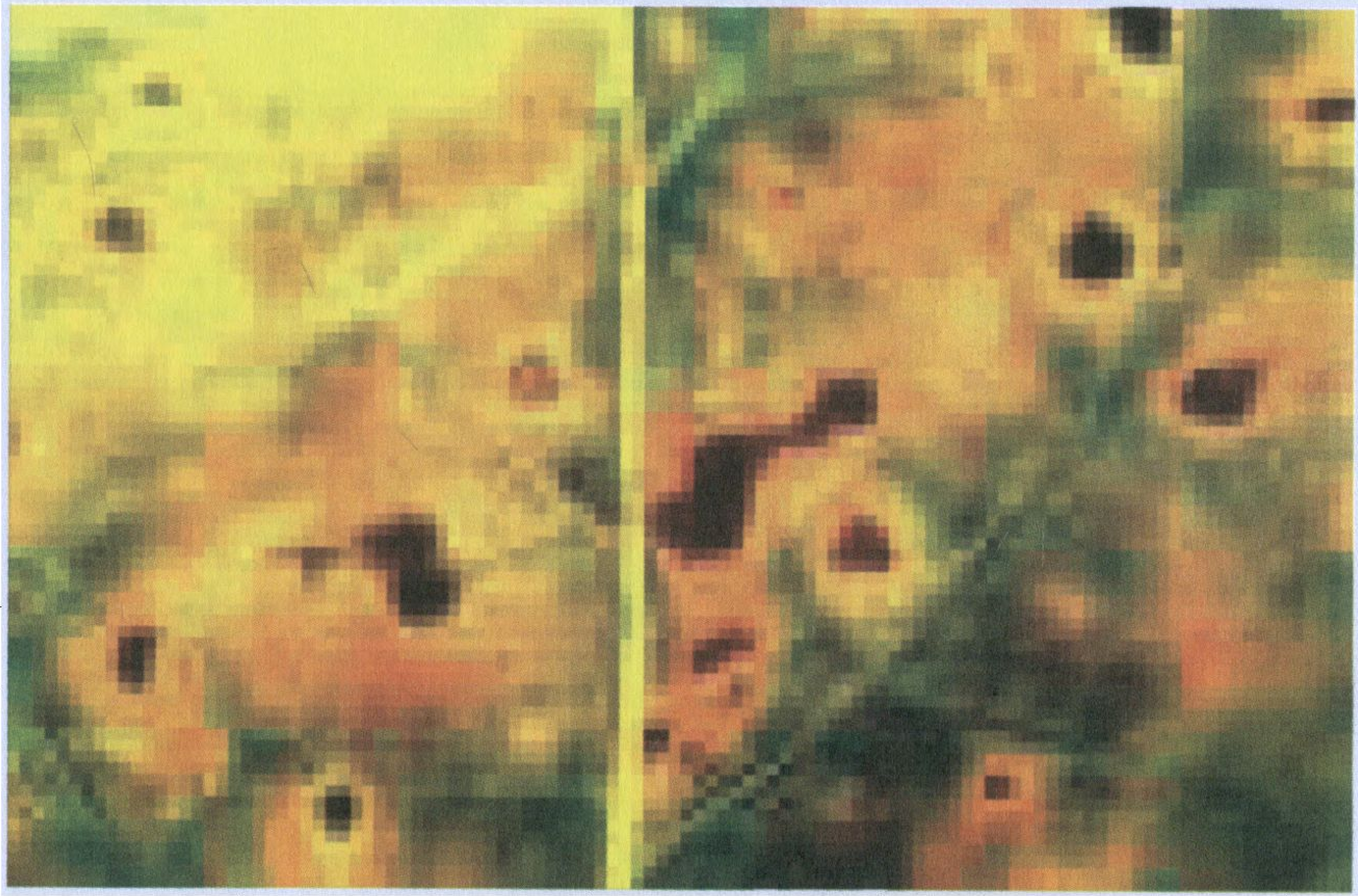
http:/www.tari.gov.tw/tarie/photo/introduction



شكل (2) الموت الموضعى للنسيج النباتى الناتج عن بكتيريا من جنس Pseudomonas

http:/www. infonet-biovision.org/res/res/files/14

2



شكل (3) عارض الاصفرار الناتج عن سم Tabtoxin

www.sut.ac.th/e-text/agri/mywebe/link3/4.htm.



شكل (4) العارض المرضى الذبول في نبات مصاب بأحد الأنواع البكتيرية المرضية

http:/www.ppdl.purdue.edu/ppdl



شكل (5) عارض الذبول المسبب عن

http:/www.extension.umn .edu Distribution/hort. Amylovorin

3

الفصل الثالث

التركيب الكيميائي للسموم المؤثرة على أمراض النبات

Chemical Structure of Toxins Effect on Plant

تمهيد

لوحظت الأعراض المُسَببة بواسطة سموم البكتيريا في النباتات المريضة ووثقت من قبل المختصين في علم أمراض النبات (Plant pathologists) منذ بداية القرن العشرين. على العكس من ذلك فإن معلوماتنا حول الطبيعة الكيميائية لهذه السموم المنتجة بواسطة هذه الكائنات المرضة محدودة جداً حتى زمن قريب. قبل سنة 1970 ليس هناك تركيب كيماوي صحيح منشور لأي سُم (عدا تلك المعروفة كهرمونات نباتية)، إلاّ أن السنوات الأخيرة شهدت فعاليات فوق مستوى الدراسات الرائدة: حيث وضح وثبت التركيب الكيميائي لعدد من سموم البكتيريا.

المثال الكلاسيكي لسموم البكتيريا هو التابتوكسين (Tabtoxin) أو ما يعرف بسم النار الهائجة (Wildfire toxin) الفعال في مرض النار الهائجة (Wildfire disease) للتبغ (انظر الفصل الثالث –4–).

ان السموم المنتجة بواسطة الكائنات المرضة للنباتات (Phytopathogens) لا يقبل تركيبها الكيميائي المقترح ما لم يوثق أو يعزز بأبحاث أخرى كالبناء الكيميائي للسموم (Chemical synthesis)، معلومات كيميائية أو بايوكيميائية إضافية، أو ربما بواسطة دراسات بيولوجية.

1. اختلاف سموم البكتيريا عن سموم الفطريات
Differences Between Bacterial Toxins and Mycotoxins

تمتاز السموم التي تكونها البكتيريا ببساطتها البيولوجية، مقارنة مع سموم الفطريات، إلاّ ان هذا لا يعكس قابليات البناء الحيوية المطلوبة في تكوين هذه السموم. حيث تمتاز سموم البكتيريا باحتوائها على تنوع كبير من الذرات المختلفة النواة (Heteroatomic nuclei) كالأوكسجين، النتروجين، الكبريت والفسفور. هناك نوعان من سموم البكتيريا تحتوي على كل هذه العناصر الفيزيولوتوكسين (Phaseolotoxin) والتاجيتيتوكسين (Tagetitoxin).

معظم سموم البكتيريا تمتاز بكونها ذات أوزان جزئية صغيرة (الوزن الجزيئي عموماً اقل من 600 دالتون). غالباً ما تكون مثبيطات للإنزيمات، ذوات فعل مضاد لنواتج الأنشطة الايضية، وقد تكون متعلقة بهرمونات نمو النباتات وفي كلا الحالتين تكون غير خاصة في عملها. على العكس من ذلك نجد ان سموم الفطريات تكون خاصة في عملها أي أنها تصيب نوعاً أو ضرباً واحداً من النبات. كما ان ليس هناك أي تقرير يشير إلى وجود سم بكتيري من مواد التربينات (Terpenoid). في حين مجموعة كبيرة من سموم الفطريات من مواد التربينات.

2. تسمية البكتيريا وتسمية سمومها
Nomenclature Of Bacteria and Their Toxins

إن نظام التسمية المعتمد من قبل Dye وجماعته (1980) هو المعول عليه، في هذا الكتاب، فيما يخص تسمية البكتيريا المرضة للنباتات (Plant pathogenic bacteria). ولأجل تلافي الالتباس بين نظام التسمية هذا وبين تسمية البكتيريا الموجودة في المنشورات والمصادر العلمية فإن الجدول 3-1 يوضح التسمية الحديثة

مع تلك الموجودة قبل 1980. وعلى أية حال فإن أسلوب التسمية الحديث هو الذي يتبنى نظام – النوع – والضرب الممرض (Species - pathovar) .

جدول 3-1: التسمية القديمة والحديثة للبكتيريا الممرضة للنباتات

3

الاسم الجديد المعتمد	الاسم القديم
لايوجد تغيير	*Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend 1907) Conn 1942
لايوجد تغيير	*Corynebacterium fascians* (Tilford 1936) Dowson 1942
C. michiganense pv. insidiosum (McCulloch 1925) Dye & Kemp 1977	*C. insidiosum* (McCulloch 1925) Jensen 1934
C. michiganense pv. michiganense (Smith 1910) Jensen 1934	*C. michiganense* (Smith 1910) Jensen 1934
C. michiganense pv. sepedonicum (Spierckermann & Kotthoff 1914) Dye & Kemp 1977	*C. sepedonicum* (Spierckermann & Kotthoff 1914) Skaptason & Burkholder 1942
لايوجد تغيير	*Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers & Smith 1920
P. syringae pv. coronafacien (Elliot 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 P.	*Pseudomonas coronafaciens* (Elliot 1920) Stevens 1925
syringae pv. atropurpureu (Reddy & Godkin 1923) Young, Dye & Wilkie 1978	*Ps. coronafaciens pv. atropurpureu* (Reddy & Godkin 1923) Stapp 1928
P. syringae pv. garcae (Amaral, Teixeira & Pinheiro 1956) Young, Dye, & Wilkie 1978	*Ps. garcae* (Amaral et al. 1956)
P. syringae pv. glycinea (Coerper 1919) Young, Dye, & Wilkie 1978	*Ps. glycinea* Coerper 1919
P. syringae pv. iachrymans (Smith & Bryan 1915) Young, Dye, & Wilkie 1978	*Ps. achrymans* (Smith & Bryan 1915) Carsner 1918
P. syringae pv. mori (Boyer & Lambert 1893) Young, Dye & Wilkie 1978	*Ps. mori* (Boyer & Lambert 1893) Stevens 1913
P. syringae pv. morsprunorum (Wormald 193 1) Young, Dye & Wilkie 1978	*Ps. morsprunorum* Wormald 1931
P. Syringae pv. phaseolicola	*Ps. phaseolicola*

(Burkholder 1926) Young, Dye & Wilkie 1978	(Burkholder 1926) Dowson 1943
P. syringae pv. savastanoi (Smith 1908) Young, Dye & Wilkie 1978	*Ps. savastanoi* (Smith 1908) Stevens 1913
لا يوجد تغيير	*Ps.solanacearum* (Smith 1896) Smith 1914
P.syringae pv. syringae Van Hall 1902	*Ps. syringae* Van Hall 1902
P.syringae pv. tabaci (Wolf& Foster 1917) Young, Dye & Wilkie 1978	*Ps. tabaci* (Wolf & Foster 1917) Stevens 1925
P.syringae pv – tagetis (Hellmers 1955) Young, Dye & Wilkie 1978	*Ps. tagetis* Hellmers 1955
P. syringae pv. tomato (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978	*Ps. tomato* (Okabe 1933) Alstatt 1944
لايوجد تغيير	*Rhizobium japonicum* (Kirchner 1896) Buchanan 1926
لايوجد تغيير	*Rh. meliloti* Dangeard 1926
لايوجد تغيير	*Rh. trifoli* Dangeard 1926
X.campestris pv. campestris (Pammel 1895) Dowson 1939	*Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939
X.campestris pv. oryzae (Ishiyama 1922) Dye 1978	*X. oryzae* (Ishiyama 1922) Dowson 1943
X.campestris pv. phaseoli (Smith 1897) Dye 1978	*X. phaseoli* (Smith 1897) Dowson 1939

أما فيما يتعلق بتسمية سموم البكتيريا فمن المفضل من الناحية العملية استخدام الأسماء العادية (Trivial) للسموم. وقد لوحظ بان استخدام الاسم الكيميائي للسم، غير مناسب من الناحية العملية، لطول التسمية ولكونها مزعجة في الاستخدامات المتكررة. على أية حال فإن التسمية العادية للسموم لا تخلو من الغموض والالتباس.

إن الاسم العادي للسم أحيانا يطلق على التحضير الغير نقي (تحضير خام Crude) للسم والذي يكون ذا صفات بيولوجية معروفة إلاّ ان تركيبه الكيميائي

غير موصوف. إلاّ ان هناك خطراً محدداً من استخدام الاسم العادي للسم دون معرفة ولو قليلة مسبقة بتركيبه الكيميائي. على سبيل المثال سم الـ *Pseudomonas syringae pv. glycinea* والذي يدعى جلايتوكسين (Glytoxin) (Strobel, 1977; Murch & Patil 1978). إلاّ ان السم قد شخص كيميائياً من 3
قبل Mitchell و Young (1978) وجد انه مشابه إلى المركب الكيميائي الذي أطلق عليه مسبقاً اسم عادي وهو الكوروناتين (Coronatine).

أما قبل التشخيص الكيميائي للسموم يمكن تسمية السموم بكلمتين:

الأولى تكون للنوع أو الضرب الممرض للكائن المنتج للسم

الثانية هي السم (Toxin).

ويوضح جدل (3-2) بعض أسماء هذه السموم.

جدول 3-2: البكتيريا المرضة للنباتات وسمومها

السم	الكائن المرض
6-(3-methyl-2-butenylamino)purine indol-3-ylacetic acid	*Agrobacterium tumefaciens*
Several N"-substituted purines (e.g. cis-zeatin)	*Corynebacterium fascians*
Tabtoxin (2-serine) tabtoxin	*Pseudomonas syringae pv. tabaci*
Tabtoxin (2-serine) tabtoxin	*Pseudomonas syringae pv. coronafaciens*
Tabtoxin	*Pseudomonas syringae pv. garcae*
Phaseolotoxin (2-serine) phaseolotoxin	*Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*
Coronatine	*Pseudomonas syringae pv. atropurpurea*
Coronatine	*Pseudomonas syringae pv. glycinea*
Syringomycin (structures un known)	*Pseudomonas syringae pv. syringae* (stone fruit, pear, grasses)
Syringotoxin (structures un known)	*Pseudomonas syringae pv. syringae* (stone fruit, pear, grasses)
Tagetitoxin- (structure not known)	*Pseudomonas syringae pv. tagetis*
Uncharacterized	*Pseudomonas syringae pv. tomato*
Uncharacterized	*Pseudomonas syringae pv. mori*
Indol-3-ylacetic acid	*Pseudomonas syringae pv. savastanoi*
Indol-3-ylacetic acid	*Pseudomonas solanacearurm*
Rhizobitoxine	*Rhizobium japonicum*
Indol-3-ylacetic acid	*Rhizobium trifoli*
Indol-3-ylacetic acid	*Rhizobium meliloti*

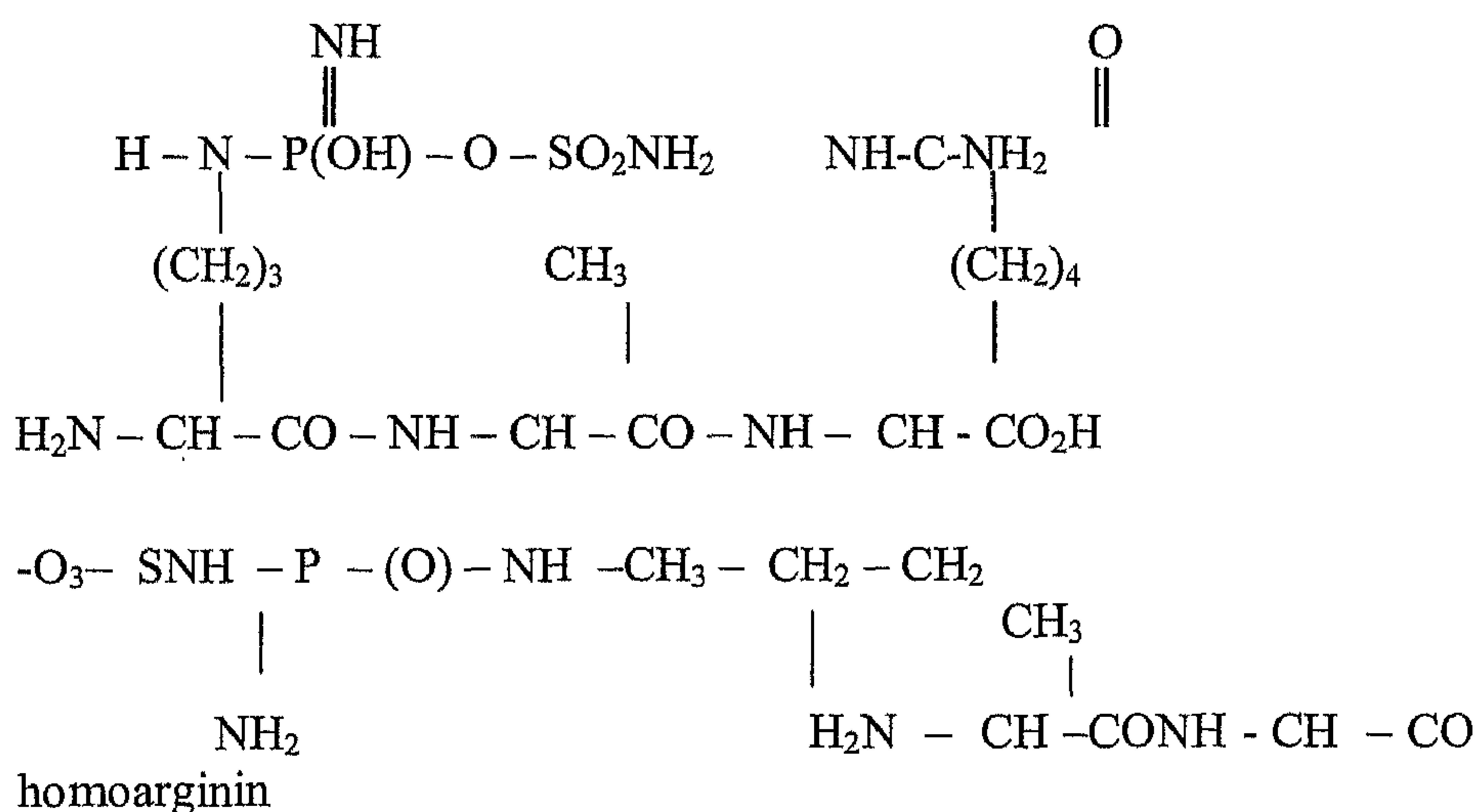
3. تركيب نواتج التمثيل الأيضي الأولية أو مشتقاتها.
Structure Of Primary Metabolites Or Their Derivatives

أ- الفيزيولوتوكسين Phaseolotoxin.

3 السم المحفز للاصفرار (Chlorosis inducing toxin) المنتج من بكتيريا *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* المسببة لمرض لفحة الهالة (Halo - blight) في نبات الفاصوليا (Bean). تنتج هذه البكتيريا عدداً من السموم في المزارع (Culture). هذه السموم درست من قبل Patil (1974)، Patil وجماعته (1972 ; 1974)، Mitchell (1978)، Mitchell و Bieleskil (1977) Mitchell و Parsons (1976).

عزل Patil وجماعته (1976) السم من راشح مزرعة بكتيريا Pseudomomnas syringae pv. phaseolicola، مركب شخص بـ N – phosphoglutamic acid وقد سمي بالفيزيوتوكسين (Phaseotoxin). ان السم المستخلص من قبل Patil وجماعته يسبب اصفرار نبات الفاصوليا ويثبط انزيم الاورنثين كارباميل ترانسفيريس (Ornithine carbamyl transferase) كما يسبب تجمع الحامض الاميني الاورنثين في النسيج النباتي. إلاّ ان تقارير الباحثين (Mitchell, 1979; Simth & Rubery 1979) تشير إلى ان التحضيرالكيميائي(Chemical preparation) لهذا المركب (N-phosphoglutamic acid) لا يمتلك الأنشطة البيولوجية المذكورة أعلاه.

Mitchell في 1976 عزل السم من راشح المزرعة البكتيرية وشخص المركب المعزول بـ $(N^{\delta}$-phosphosulphamyl) Ornithyalanylhomoarginine وسمي بالفيزيولوتوكسين (شكل 3-1)



phaseolotoxin, sulpho-diamino- phosphinyl peptide

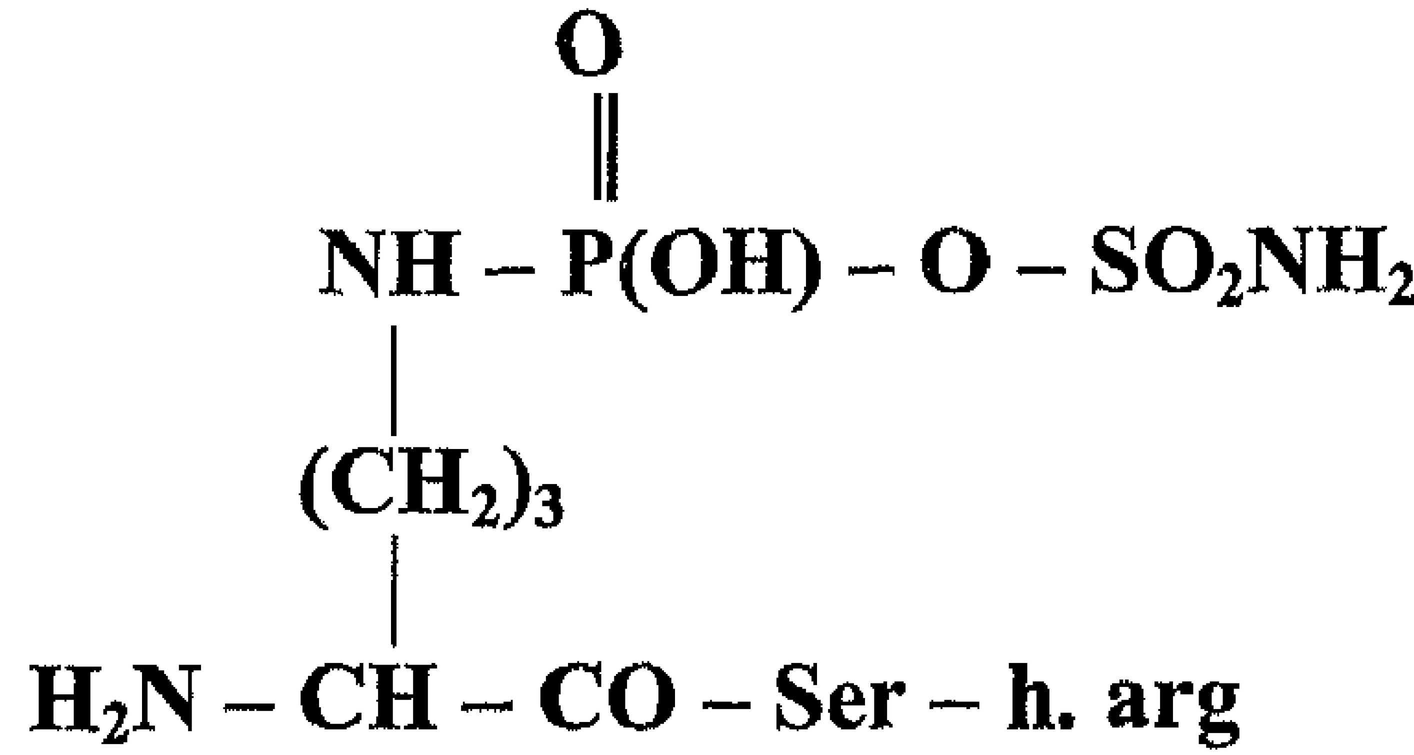
شكل 3-1 : تركيب الفيزيولوتوكسين المقترح من قبل Mitchell (1976).

ان البيانات والمعلومات الطيفية للرنين النووي المغناطيسي (NMR) منطبقة تماماً مع هذا التركيب المقترح للفيزيولوتوكسين. والشكل الكيميائي للفيزيولوتوكسين عبارة عن ببتيد ثلاثي (Tripeptide) يحتوي على اثنين من الأحماض الامينية القاعدية الاورنثين والهوموأرجنين (Homoarginine) وهي ليست من المكونات الأساسية للبروتين.

أما المركب الثانوي الموجود في المزرعة البكتيرية فهو نظير للمركب السائد الأول، Phaseolotoxin (2-serine) وهو عبارة عن] N^{s}-phosphosulphamyl) ornithylseryl homoarginine]. تمكن Mitchell و Parsons (1977) من عزل هذا المركب من المزرعة البكتيرية (شكل 3-2).

المركبان الأخيران يحفزان الاصفرار في أوراق نباتات الفاصوليا، ويتجمع الأورنثين في النسيج المصفر ويسببان كذلك اصفرار الوريقات الثلاثية الصغيرة (Mitchell & Bieleski, 1977 ; Mitchell, 1978) ولعل سبب التعارض بين المركبات المذكورة أعلاه يعود إلى اختلاف الطرق المستخدمة من قبل Patil و 3
Mitchell لعزل وتنقية السم من الأنسجة المريضة.

وعلى أية حال فإن الاسم فيزيوتوكسين (Phaseotoxin) يبدو من غير المبرر استخدامه الآن، وعليه أصبح غير ملائم للاستعمال في التسمية.



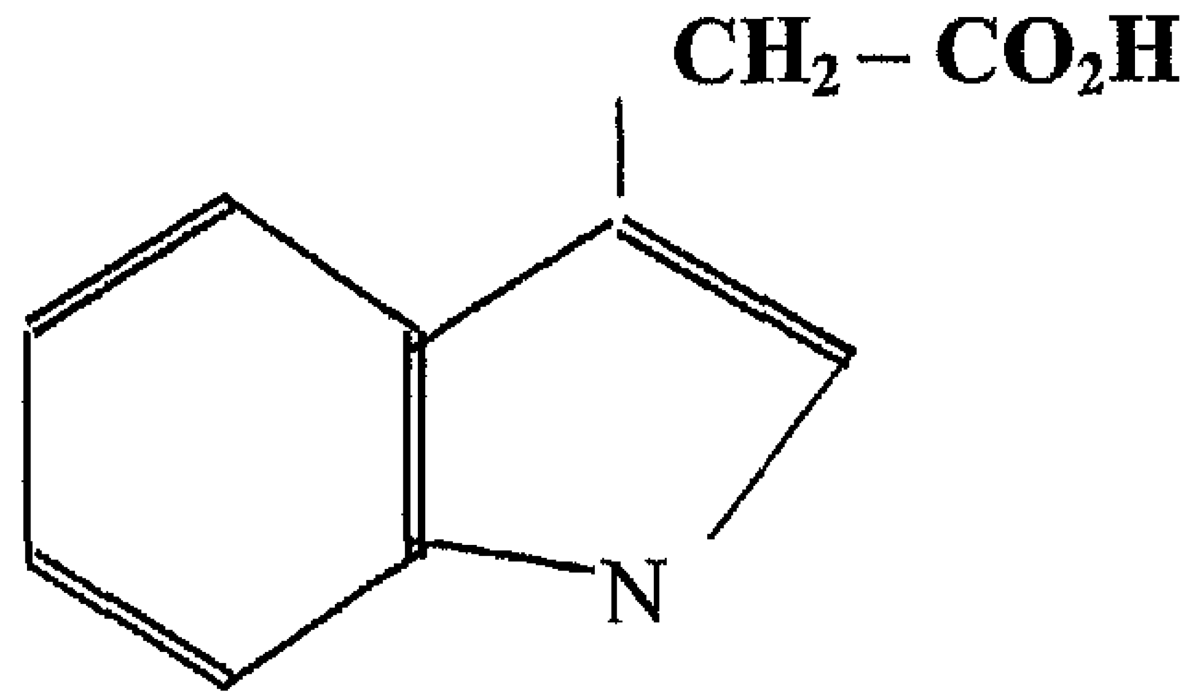
شكل 3-2: **المركب النظير للفيزيولوتوكسين** (2 – Serine) Phaseolotoxin
(Mitchell&Parson,1977)

وحال ظهور أعراض الاصفرار في أوراق نبات الفاصوليا فإن المركب المستخلص من الأنسجة المصابة يحتوي على كمية قليلة من الفيزيولوتوكسين والسيرين فيزيولوتوكسين Phaseolotoxin (-Serine2) وان المركب هو - N^{s}) oenithine (phosphosulfanyl، الناتج من فعل الإنزيمات المحللة للببتيدات (Peptidase) على الفيزيولوتوكسين، وعليه فإن المركب ليس ناتجاً أولياً من نواتج البكتيريا داخل جسم النبات بل هو ناتج ثانوي من خلال تحلل الفيزيولوتوكسين بواسطة الأنزيمات المحللة للببتيدات (انظر الفصل الرابع).

ب- اندول حامض الخليك Indoleacetic acid

مركب اندول حامض الخليك Indol-3-ylacetic acid (IAA) (شكل 3-3) منظم النمو في النباتات العليا، ينتج هذا المركب في المزرعة السائلة (liquid culture) من قبل عدة أنواع من البكتيريا الممرضة (Bacterial pathogens) منها:

Pseudomonas syringae , pv. savastonoi , pv. solanacearum ; Rhizobium trifloi , R. meliloti ; Agrobacterium tumeafaciens



شكل 3-3: اندول حامض الخليك Indoleacetic acid

في حالة إصابة هذه البكتيريا للنبات يلاحظ زيادة في مستوى مركب أندول حامض الخليك (IAA). وبالتالي حدوث حالة من عدم التوازن الهرموني داخل جسم النبات والذي له نتيجة منطقية نحو نشوء المرض (Sequira, 1973; Pegg, 1976).

4. تركيب نواتج التمثيل الايضي الثانوية المعقدة للأحماض الأمينية
Structure Of Complex Secondary Metabolites Of Amino Acids

أ- التابتوكسين Tabtoxin

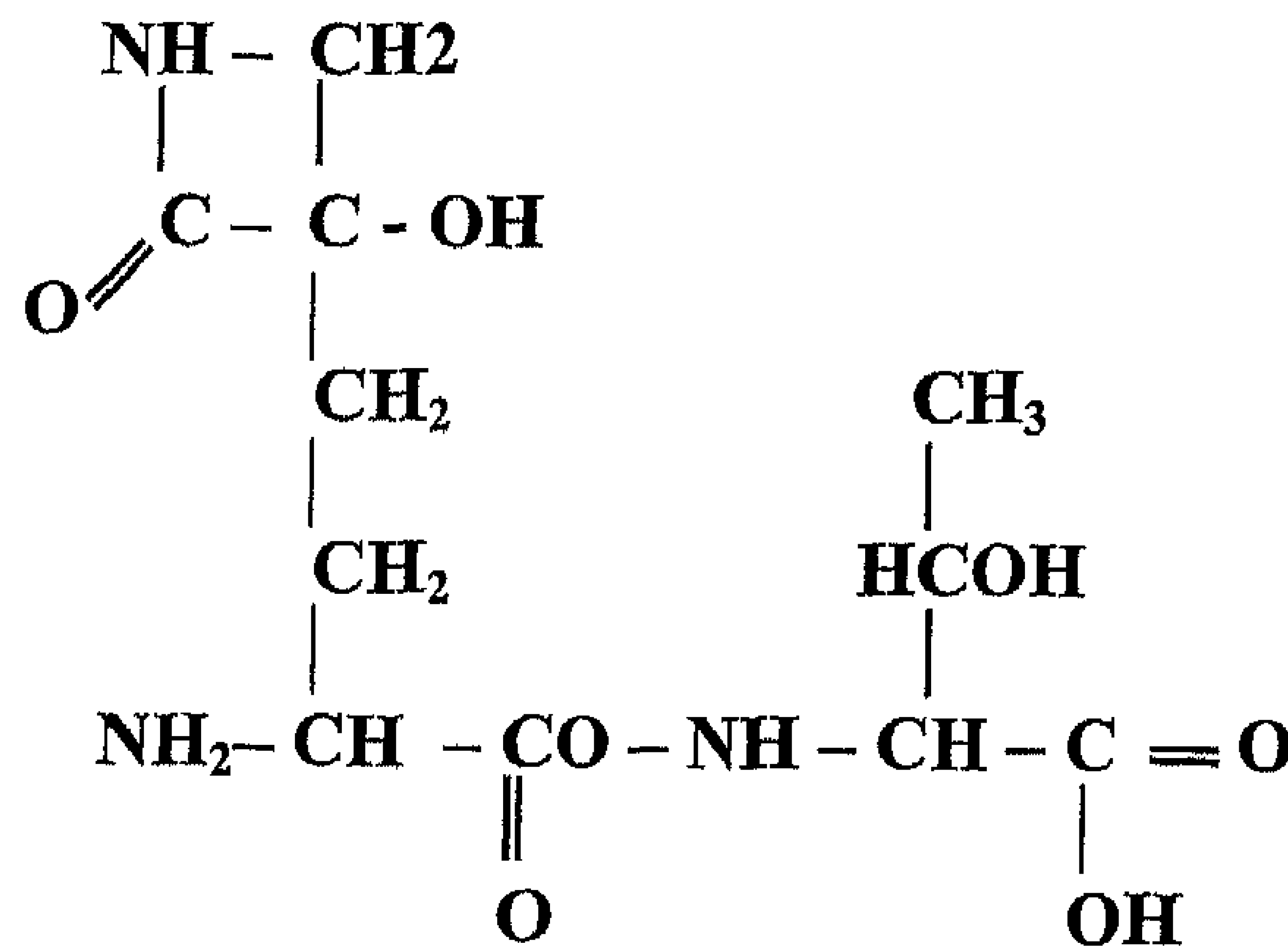
السم المحفز للاصفرار وهو العامل المسبب لمرض النار الهائجة (Wildfire disease) في نبات التبغ (Tobacco) والنباتات الأخرى. يُنتج السم من قبل بكتيريا Pseudomonas syringae pv. tabaci، ويُنتج التابتوكسين (Tabtoxin) أيضا من قبل بعض سلالات الضرب المرضي

Pv. coronafaciens الناشئة أصلا من مضائف نباتية مختلفة كالشوفان (Oat)، (Sinden & Durbin, 1970)، الذرة (Maize) ونبات عشب أوربي (Timothy)، (Riberio et al., 1977).

3

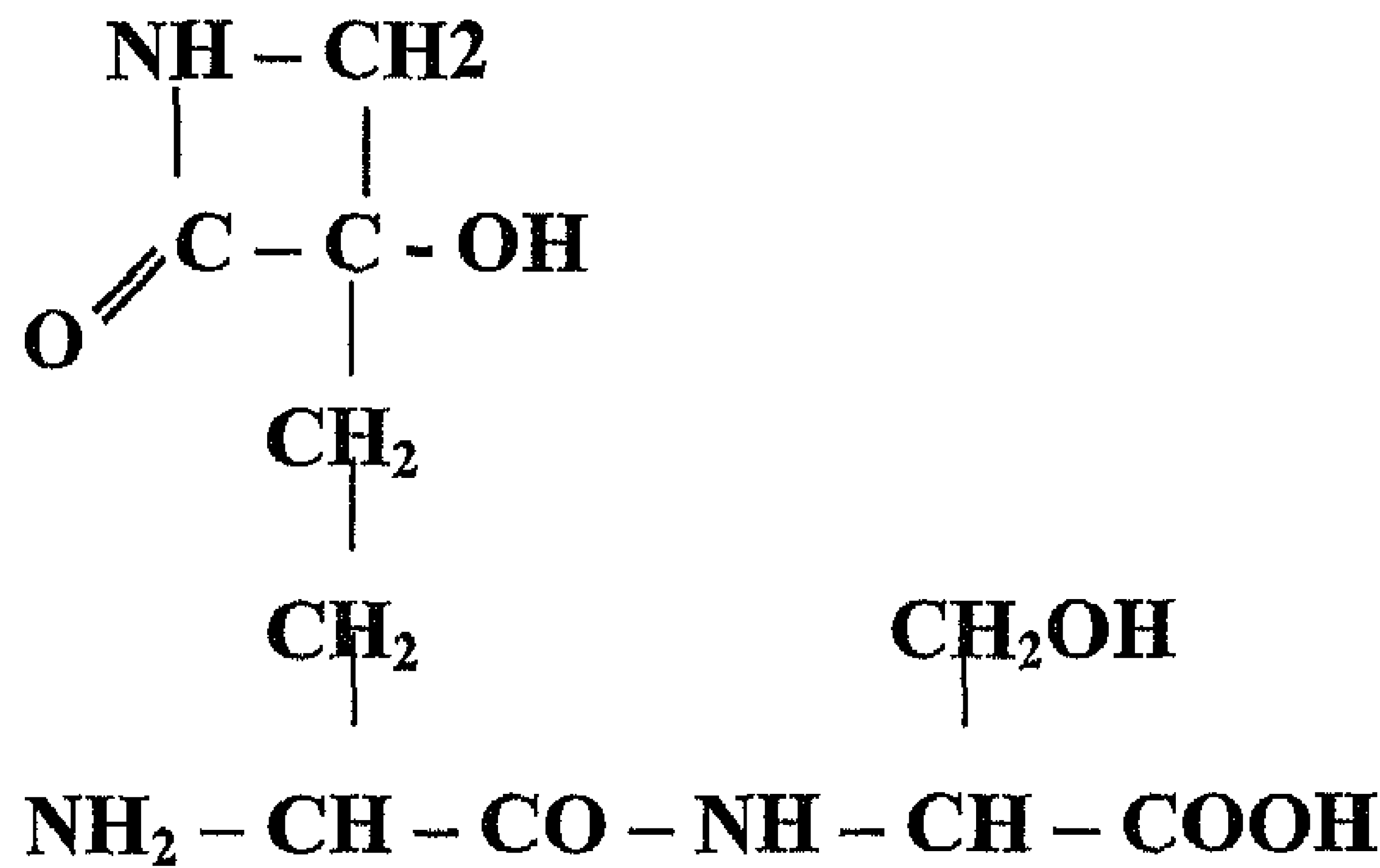
التابتوكسين عُزل لأول مرة من قبل Woolley وجماعته (1952 a & b) اقترح تركيباً كيميائياً والذي أثبتت فيما بعد عدم صحته، فعلى الرغم من وجود احد الأحماض الامينية المكونة له وهو التابتوكسنين (Tabtoxinine)، فشل في تعيين الحامض الاميني الأخر وهو الثريونين (Threonine) وسجل بدله حامض اللاكتيك (Lactic acid)، (Woolley et al., 1955).

التركيب الكيميائي المقبول للسم هو المقترح من قبل Stewart (1971)، (شكل 4-3) . ثبت التركيب الكيميائي للتوكسين باستخدام تقنية الرنين النووي المغناطيسي (NMR). التابتوكسين عبارة عن ببتيد ثنائي (Dipeptides) يحتوي على التابتوكسنين – بيتا – لاكتام (Tabtoxinine - B - lactam) المرتبط بالمجموعة الامينية (Amino group) أما للحامض الاميني الثريونين (Therionine) أو للحامض الاميني السيرين (Serine)، (Stewart, 1971 & Taylor et al., 1972).



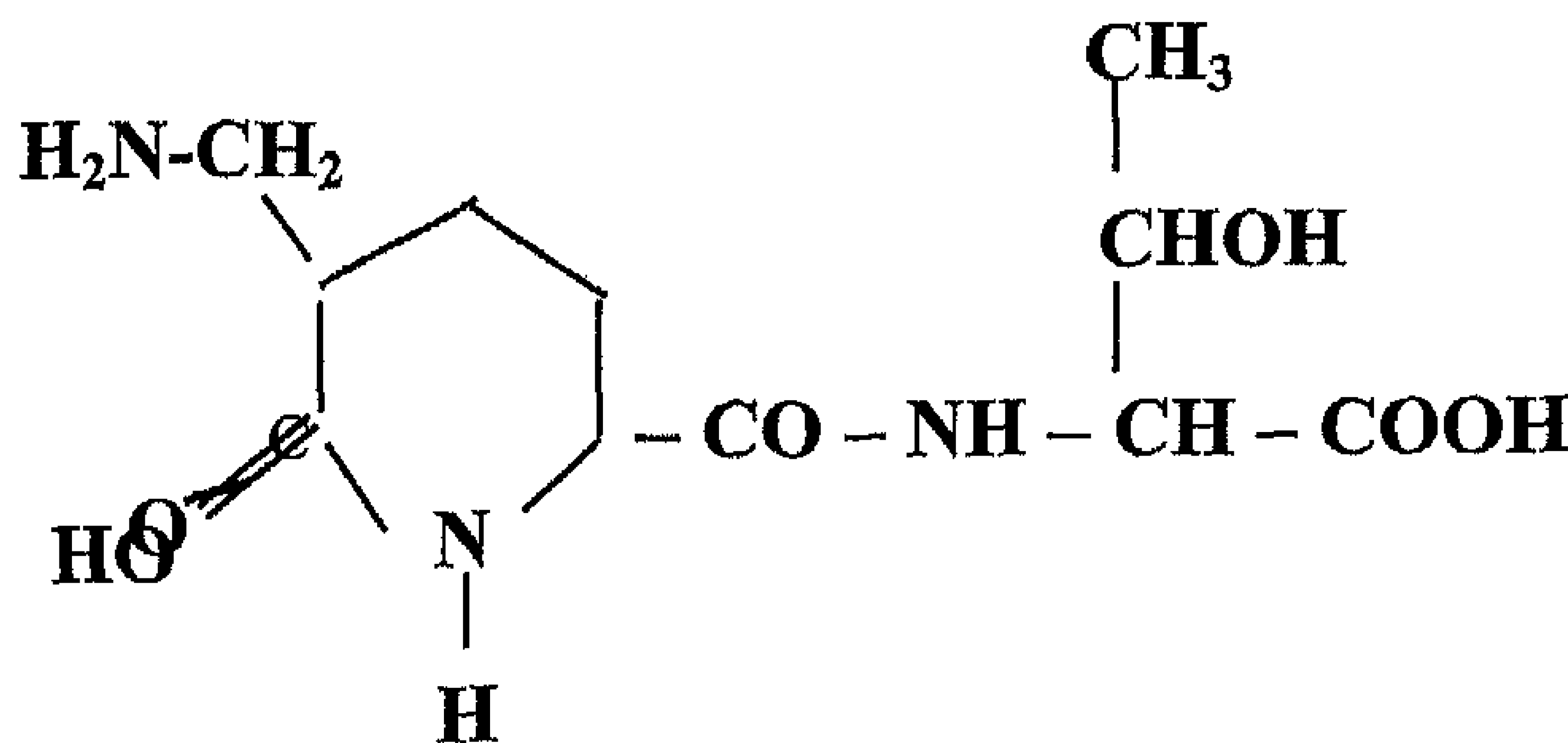
شكل 3-4: تركيب التابتوكسين المقترح من قبل Stewart (1971)

وتمتاز معظم سلالات الـ Pseudomonas المنتجة للتابتوكسين بكونهـا تنـتج نظير السيرين Serine analog (شكل 3-5) بصورة متفاوتة ولكن بكميـات قليلـة مقارنة بالتابتوكسنين (Tabtoxinine) .



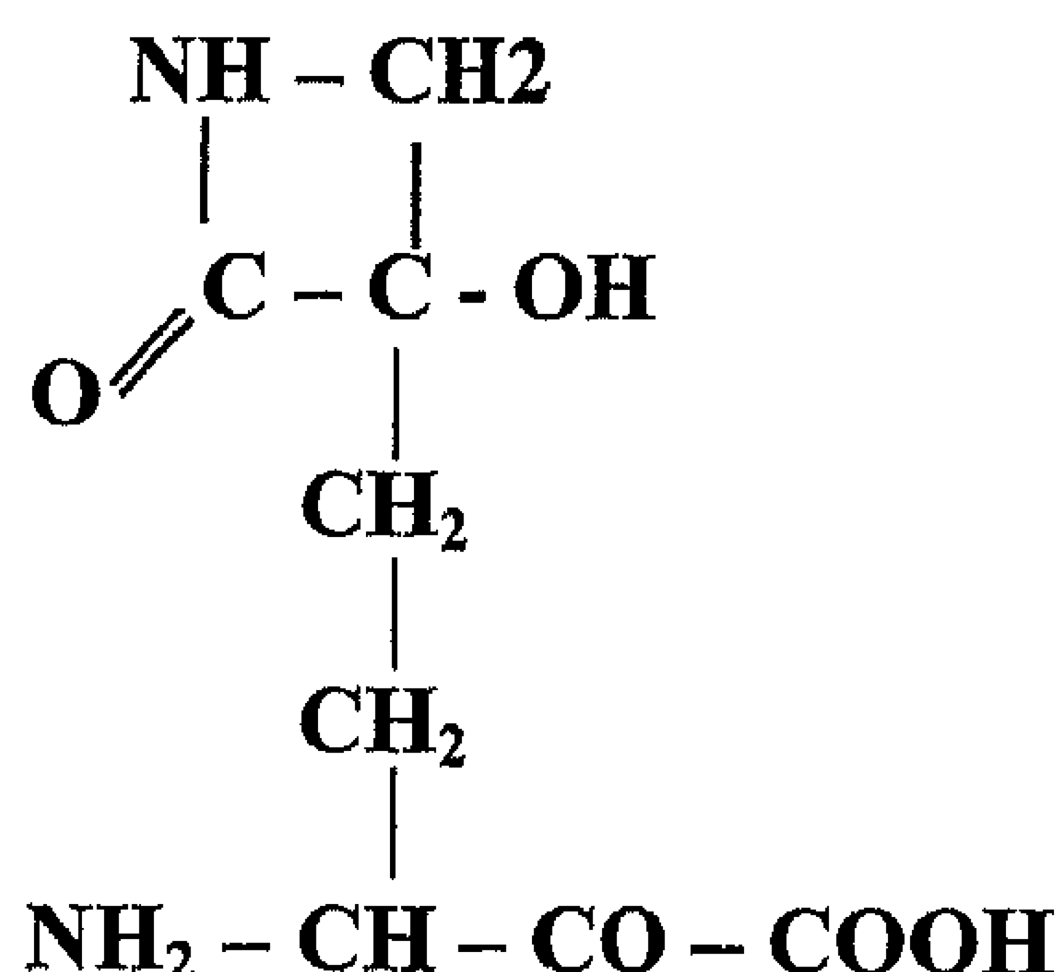
شكل 3-5: تابتوكسين سيرين Tabtoxin (Serine-2)

يمتاز التابتوكسين بكونه غير ثابت بسبب مجموعة الـ – بيتا – لاكتام (B – lactam) الغير ثابتة الموجودة في احد الحوامض الامينية المكونة للسم حيث تتحول هذه المجموعة إلى جاما لاكتام lactam - δ وبذلك يتكون المركب الغير الفعال المدعو بـ أيزوتابتوكسـين Isotabtoxin (شكل 3-6)



شكل 3-6: ايزوتابتوكسين Isotabtoxin

كـذلك عـزل مـن راشـح المـزروع الـبكتري لبكتيريـا pv. tabaci مركـب التابتوكـسنين – بيتـا – لاكتـام Tabtoxinine-B-lactam ,R. Taha ph.D thesis (Durbin et al., 1978 ; 1984) كما وثبت تركيبه الكيميـائي باسـتخدام جهـاز الرنين النووي المغناطيسي (شكل3-7). ومما يجدر الإشارة إليه أن هذا المركب هو 3
ليس ناتجاً أوليـاً للبكتيريـا إلاّ انـه يظهـر في الوسـط كنـاتج ثـانوي بعـد تحليـل التابتوكـسين بواسـطة الأنزيمـات المحللـة للببتيـدات (Peptidase)، (Uchytil & Durbin, 1980). راجع الفصل الرابع.



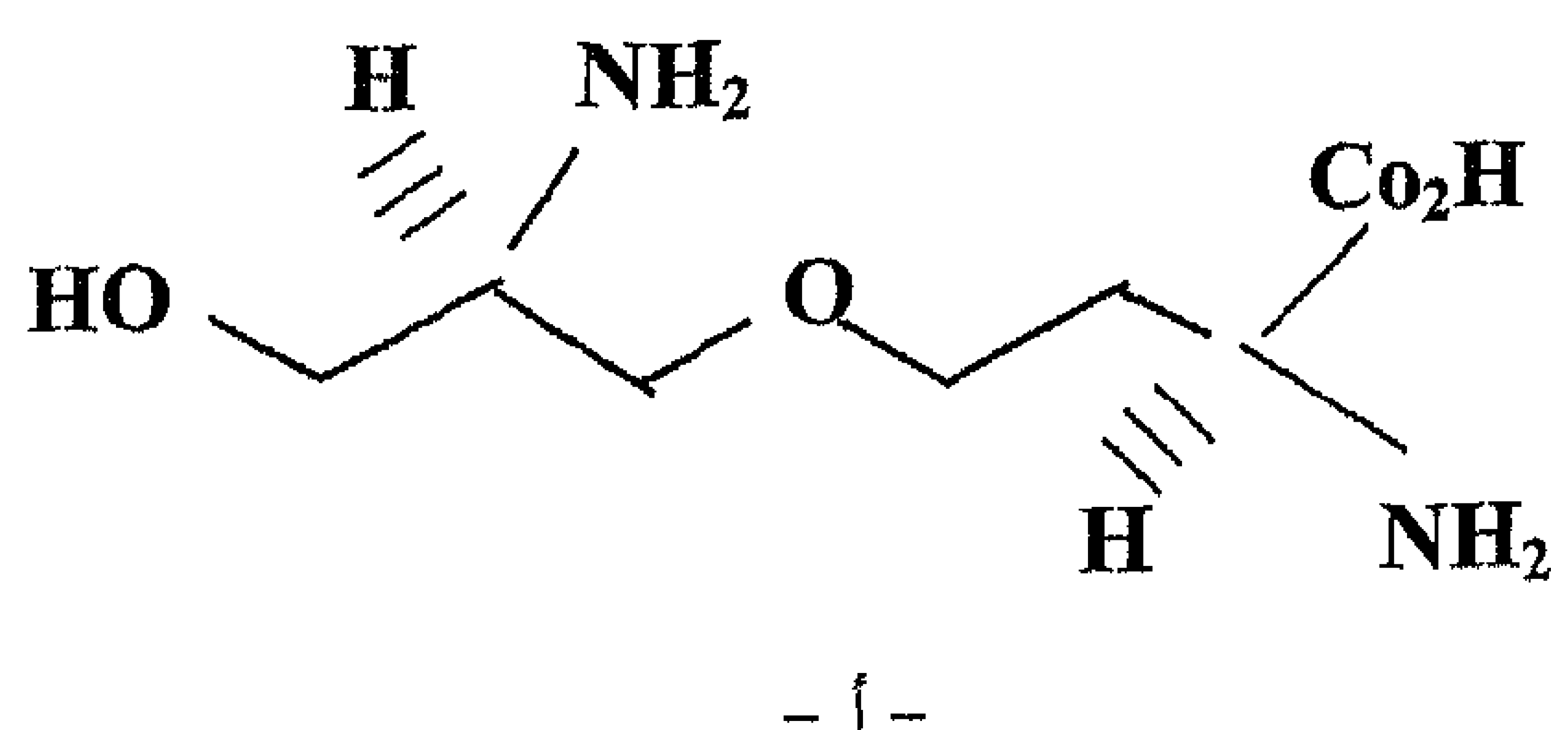
شكل 3-7: التابتوكسين – بيتا – لاكتام Tabtoxinine - B - lactam

ب- الرايزوبتوكسين Rhizobitoxin.

بعض سلالات بكتيريا Rhizobium japonicum المثبتة للـنتروجين في العقـد الجذرية لنبات فول الصويا (Soybean)، تقوم ببناء السم الـذي يـسبب اصـفرار الأوراق الحديثـة النمـو (Owens & Wright, 1965) . تمكـن Owens و Wright (1965 a & b) من عزل الرايزوبتوكسين من داخل جـسم النبـات In vivo ومـن العقد الجذرية وبعد ذلك تمكنا من عزله من راشح المزروع البكتيري.

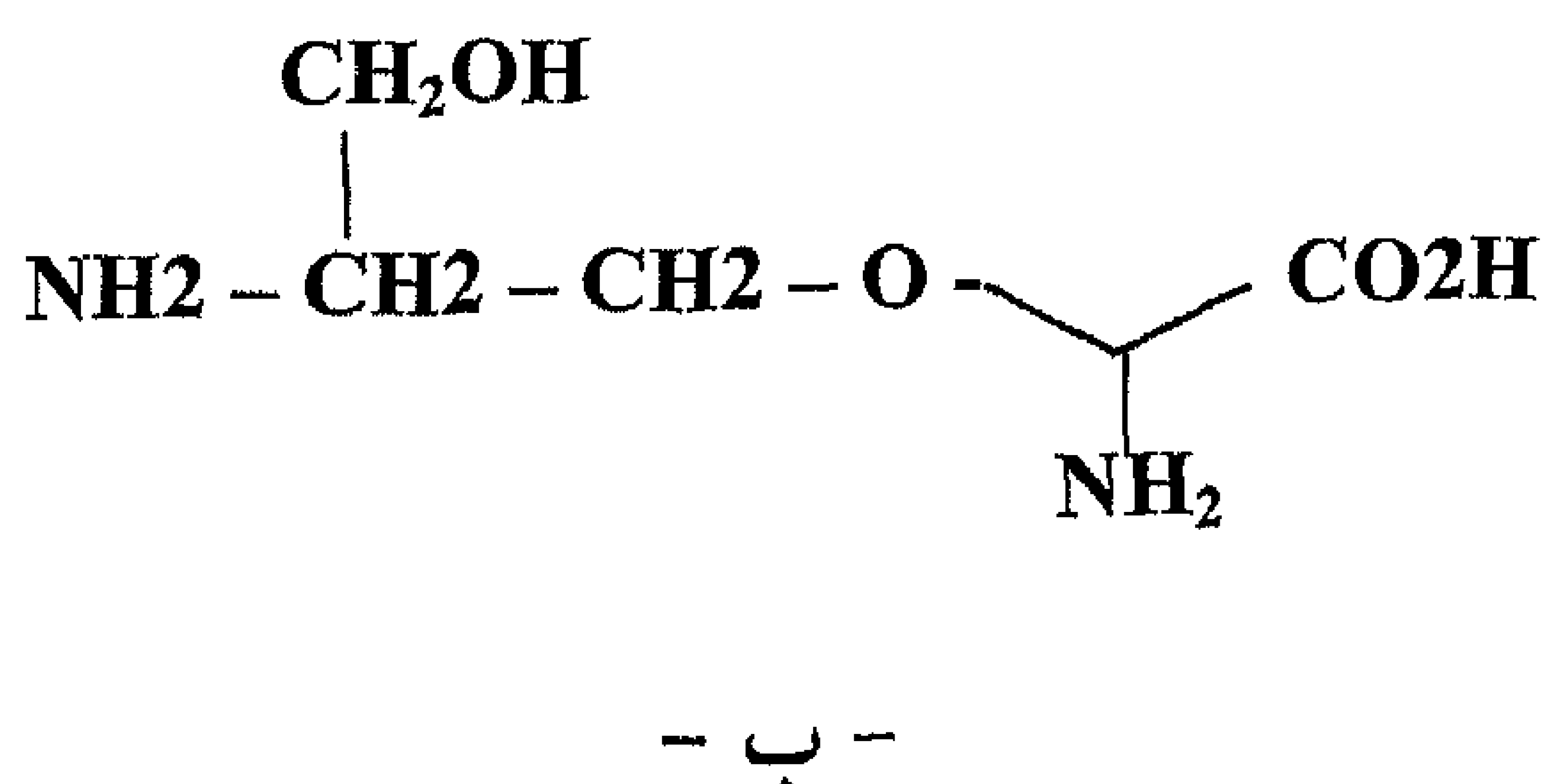
التركيب الكيميائي للرايزوبتوكسين وضح لأول مرة من قبل Owens وجماعته (1972a) وهو عبارة عن - 2 - amino - 4 - (2amino- 3hydroxypropyl) trans - but - 3 - enoic acid

والتركيب الكيميائي الكامل للرايزوبتوكسين اظهر بواسطة التحليل الطيفي للرنين النووي المغناطيسي (Owens et al., 1972 b). والشكل العام المطلق والتركيب الكيميائي للرايزوبتوكسين موضح في الشكل 3-8 (أ، ب) كما أشار إليه Keith (1975).



- أ -

شكل 3-8: الشكل العام للرايزوبتوكسين طبقاً إلى Keith وجماعته (1975)



- ب -

شكل 3-8: التركيب الكيميائي للرايزوبتوكسين طبقاً إلى Keith (1975)

5. الكربوهيدرات Carbohydrates

أ- الاميلوفورين Amylovorin.

يتتج من قبل بكتيريا Erwinia amylovora الممرضة للعديد من الأنواع النباتية العائدة لفصيلة الورديات (Rosaceae) والمسببة لمرض لفحة النار (Fire blight) في نبات التفاح والأجاص. 3

عزل السم من الراشح البكتيري على سطح شرائح ثمرة التفاح الملقحة ببكتيريا E. amylovora . السم عبارة عن مركب من سكريات متعددة (Polysaccharide) حيث يتكون من 98٪ جالكتوز (galactose) في شكل بوليميري (متكون من عدة أجزاء متماثلة) و 0.376٪ من البروتين وله وزن جزيئي حوالي $1.65x10^5$ دالتون (Goodman et al., 1974).

لم يتمكن Goodman وجماعته من عزل السم من راشح النمو البكتيري في وسط مغذٍ ذي تراكيب محددة (Defined medium).

استطاع Beer وجماعته (1977) و Beer و Wood (1978) من عزل السم (السكريات المتعددة) من راشح النمو البكتيري. والمركب المعزول من راشح النمو البكتيري مماثل لذلك المعزول من راشح البكتيريا على سطح النبات على أساس التحليل الكروموتوغرافي (Chromatography) والفحوصات السيرولوجية (Serological tests)، (Beer et al., 1977).

ب- دالتون

هناك مركب أخر ينتج من قبل بكتيريا Corynebacterium insidiosum والذي يكون له وزن جزئي عالٍ 5000.000 دالتون وهو عبارة عن جلايكوببتيدات (Glycopeptide) . يسبب هذا المركب مرض الذبول في نبات البرسيم (Alfa alfa)، (Van Alfen & Turner, 1975).

6. النواتج الايضية للمركبات المتنوعة أو المشكوكة الأصل
Metabolites Productes Of Mixed Or Uncertain Origin

أ. الكوروناتين Coronatine.

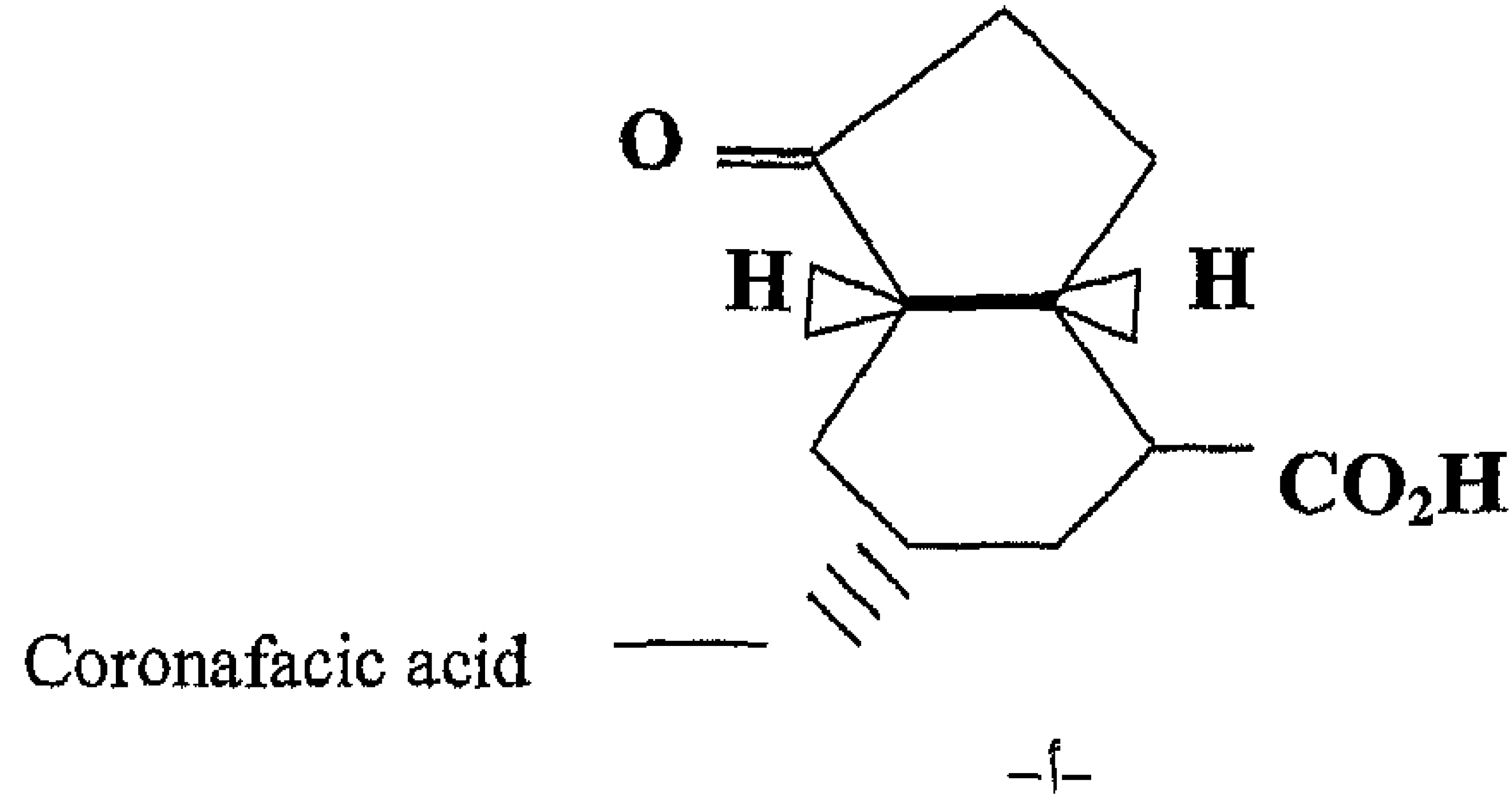
تنتج هذا السم العديد من الضروب المرضية .Pseudomonas syringae pv atropurpurea (Nishiyama et al., 1976) وpv. Glycinea (Mitchell & Young, 1978).

يسبب السم الاصفرار (Chlorosis) في الأعشاب (Grasses)، الزوان (Ryegrass) وفول الصويا (Soya bean) .

اشتق اسم الكوروناتين من اسم الكائن الحي الذي أنتج السم لأول مرة وهو P. coronafaciens sp atropurpurea حيث يعتبر مشابهاً تماماً إلى P. coronafaciens (المرادف الآن إلى Ps. syringae pv. coronafaciens) ولكن الآن يعتبر متميزاً عنه في كل الصفات وعليه اخذ اسمه الخاص به هو Ps. syringae . pv. atropurpurea

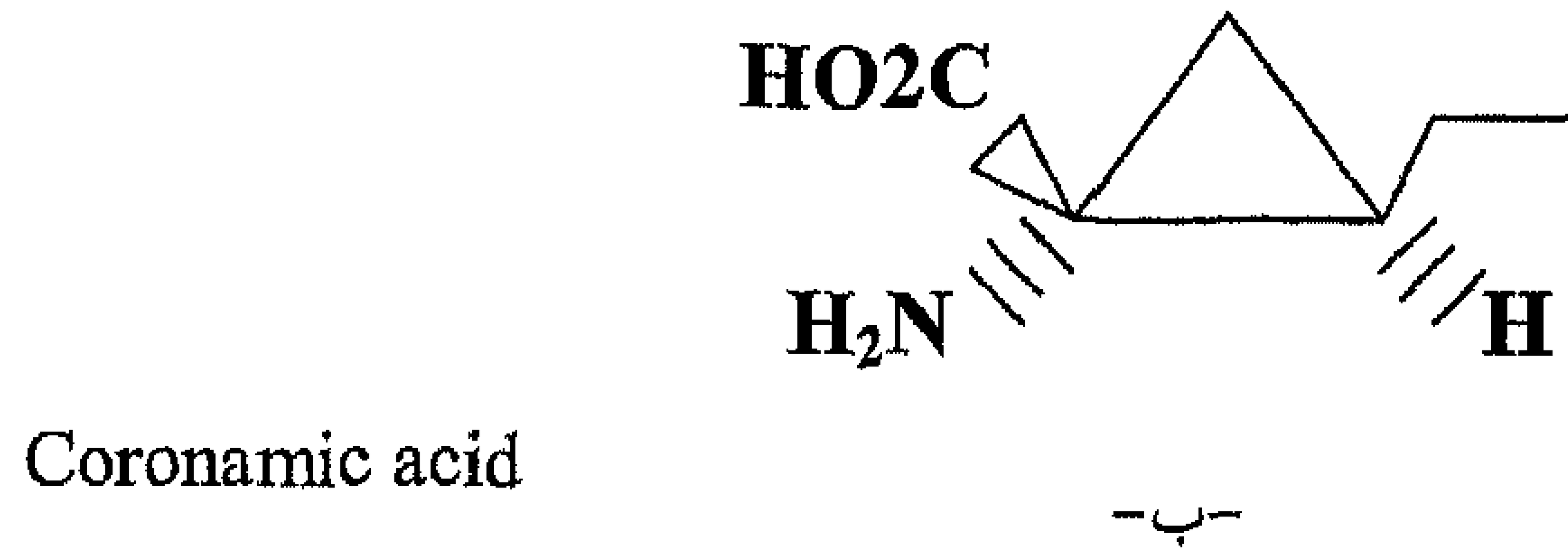
ينتج هذا السم في الوسط المغذي السائل، للبكتيريا المذكورة أعلاه، بدرجة 18م° ولمدة 6 أيام. الصيغة الكيميائية للكوروناتين $C_{18}H_{25}O_4N$ وهو عبارة عن جزئين رئيسين $C_{12}H_{15}O_2$ و $C_6H_{10}O_2N$ المرتبطان مع بعضهما بأصرة اميد (amide linkage) والوزن الجزيئي له MW319، ثبت هذا المركب بجهاز قياس الأطياف الكتلي (Mass spectrometry) (Ichihara et al., 1977). الجزيئان المكونان لهذا السم هما حامض كوروناكفيسك Coronafacic acid وحامض كوروناميك (Coronamic acid) (شكل 3-9 أ، ب) ويوضح الشكل 3-10 الهيئة الكيميائية

المجسمة للكوروناتين. تشير البحوث إلى وجود تشابه بين Coronafacic acid و Coronamic acid مع حامض جاسمونيك Jasmonic acid (Koda et al.,1996).



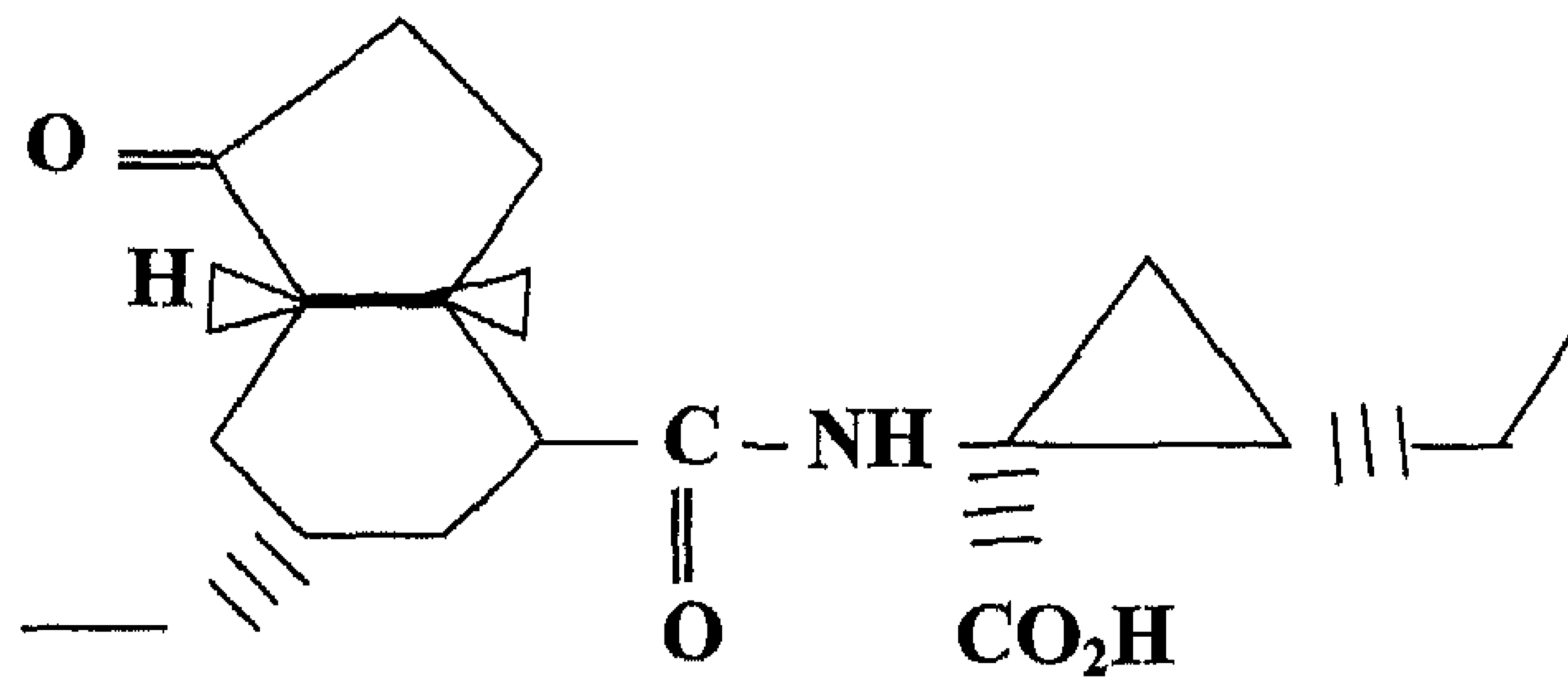
-أ-

شكل 3-9: حامض الكورونافيك وحامض الكوروناميك



-ب-

شكل 3-9: حامض الكورونافيك وحامض الكوروناميك



شكل 3-10: الهيئة الكيميائية المجسمة للكورونامين

ب- السيرينجومايسين Syringomycin.

معظم السلالات المرضية لبكتيريا الـ Pseudomonas syringae pv. syringae المرضة للفواكه الصخرية (Stone fruits) والنباتات الأخرى في 33 عائلة نباتية مختلفة، تنتج سم يعرف بالسيرنجيومايسين (Syringomycin). ويمتاز السيرنجيومايسين بانه له تأثيراً سمياً لمدى واسع من الأحياء الجهرية وبذلك فانه يتملك صفة المضادات الحيوية (Backman & DeVay, 1971; Sinden et al., 1971).

يسبب السيرنجيومايسين موت النسيج الموضعي (Necrosis) في ساق شجرة الخوخ (Sinden et al., 1971)، التشبع أو التنقع بالماء (Water soaking) الاصفرار (Chlorosis) والموت الموضعي للنسيج في نبات الذرة (Gross & DeVay, 1977).

يُنتج السيرنجيومايسين في وسط المرق الدكستروز والبطاطا (Potato dextrose broth). ويتكون السم من أربعة أحماض امينة كمكونات رئيسية. شخص ثلاثة أنواع من الأحماض الامينية، بواسطة كروماتوغرافي تبادل الايونات (Ion exchange chromatography) وجهاز محلل الأحماض الامينية (Amino acid analyzer) وكانت سيرين (Serine)، فنيل النين (Phenylalanine) وارجنين (Arginine) تتواجد الأحماض الامينية المذكورة أعلاه بنسب2مول:1 مول: 1 مول على التوالي إضافة إلى 2 مول من حامض أميني أخر مجهول الهوية وبذلك يُعتقد بان السم عبارة عن ببتيدسداسي (Hexapeptide)، (Gross et al., 1977).

وعلى أية حال فإن المعلومات المتوفرة عن التركيب الكيميائي للسيرنجيومايسين محدودة وقليلة جداً، ويبدو انه يحتوي على تركيب ببتيدي هو سيرين: سيرين: فنيل النين: ارجنين ومكوّن أخر أو مكونات أخرى تحتوي على

15 ذرة كربون مشبعة بالأوكسجين (Oxygenated) ومن المحتمل ان تكون شبيهة بالكاربوهيدرات (Gross et al., 1977).

3

جـ- السيرنجوتوكسين Syringotoxin.

تنتج بكتيريا Pseudomonas syingae pv. syringae السلالة المرضة فقط لنباتات الحمضيات (Citrus spp)، سم يطلق عليه السيرنجيوتوكسين (Syringotoxin) . يمتاز السم بالإضافة إلى فعاليته المشابهة للسيرنجيومايسين يكون مضاداً حيوياً يثبط نمو فطر Geotrichum candidum (Gross & De Vay, 1977).

يتكون السيرنجيوتوكسين من خمسة من المكونات الموجبة لفحص تفاعل النهايدرين (Ninhydrin) الخاص بالكشف عن الحوامض الامينية أو على الأصح تحديد مجموعة الأمين الحر (Free amino group)، اربعة من هذه المكونات تم تحديد هويتها وهي الثريونين (Threonine)، السيرين (Serine)، الكلايسين (Glycine) والارنثين (Ornithine) وبنسبة 1:1:1:1 مول. المكون الخامس للسم لا يمكن تمييزه عن المركب الاخر المجهول المكون للسيرنجيومايسين.

ونظراً للتشابه الكبير في الأنشطة البيولوجية والصفات الكيميائية للسيرنجيومايسين والسيرنجيوتوكسين فإن هذا يقترح بان التركيب الكيميائي متشابه لهذين المركبين (Gross et al., 1977; Ballio et al., 1990; Dalla et al., 1999).

د. التاجيتيتوكسين Tagetitoxin.

تسبب بكتيريا الـ Pseudomonas syringae pv. tagetis تبقع والاصفرار، أحيانا، في الأوراق العليا لنبات الاذريون أو القطيفة (Marigold)، (Trimboli et al., 1978; Styer et al., 1980).

إن سبب هذه الأعراض هـو نتيجـة لفعـل سـم، عُـزل فيمـا بعـد، ونُـقي كـيـمـيـائـيـاً وعُـرف بالتاجيتيتوكسين (Tagetitoxin)، .(Mitchell et al., 1978; mitchell & Durin, 1981)

يُنتج السم بتنمية البكتيريا في وسط مغذي سائل ذي مكونات معينة. عـزل الـسم مـن الوسـط المغـذي صـعب جـداً لكونـه ذات طبيعـة محبـة للمـاء (Hydrophilic) ولا يستخلص بالمذيبات العضوية ولا يمتص من قبـل الأوسـاط الصلبة كالفحم النباتي (Charcoal).

أن التاجيتيتوكـسين المنقـى بطريقـة طبقـة الكرومـاتوغرافي الرقيقـة (Thin layer chromatography) يتفاعـل مـع مركـب النـنهايـدرين (Ninhydrin) معطياً لوناً وردياً إلى بنفسجي كدليل على وجود مجموعة الامـين، ويتفاعـل مـع المولبدات (Molybdate) مشيراً إلى وجود مجموعـة الفـسفور. وقـد أكـد وجـود الفسفور باستخدام تقنية الرنين النووي المغناطيسي (NMR).

إن تقنية الرنين النووي المغناطيسي (NMR) وجهاز قياس الأطياف الكتلـي (Mass – spectroscopy) تشيران إلى ان الوزن الجزيئي التخميني للتاجيتيتوكسين هو MW435 دالتون . أن المعلومات والبيانات التي يعطيها جهاز الـرنين النـووي المغناطيسي لوزن جزيئي بمقدار 435 تساوي صيغة جزيئة $C_{11}H_{18}O_{15}NP$. وأكـد Mitchell و Durbin (1981) وجود الكبريت S في تركيب السم باستخدام تقنية النظائر المشعة، حيث نميت البكتيريا في وسط مغـذ حـاو علـى الكبريـت المـشع $^{35}SO_4^{-2}$. ولذلك فإن الاعتقاد السائد الآن هو ان التاجيتيتوكسين يحمـل الـصيغة الكيميائية الأخيرة.

كما إن المعلومات الطيفية (Spectral data) تشير إلى عدم تشابه التاجيتيتوكسين مع الفيزيولوتوكسين الذي يحتوي على الكبريت، النتروجين والفسفور.



شكل (1) أعراض مرض النار الهائجة في نبات فول الصويا بسبب سم الكوروناتين

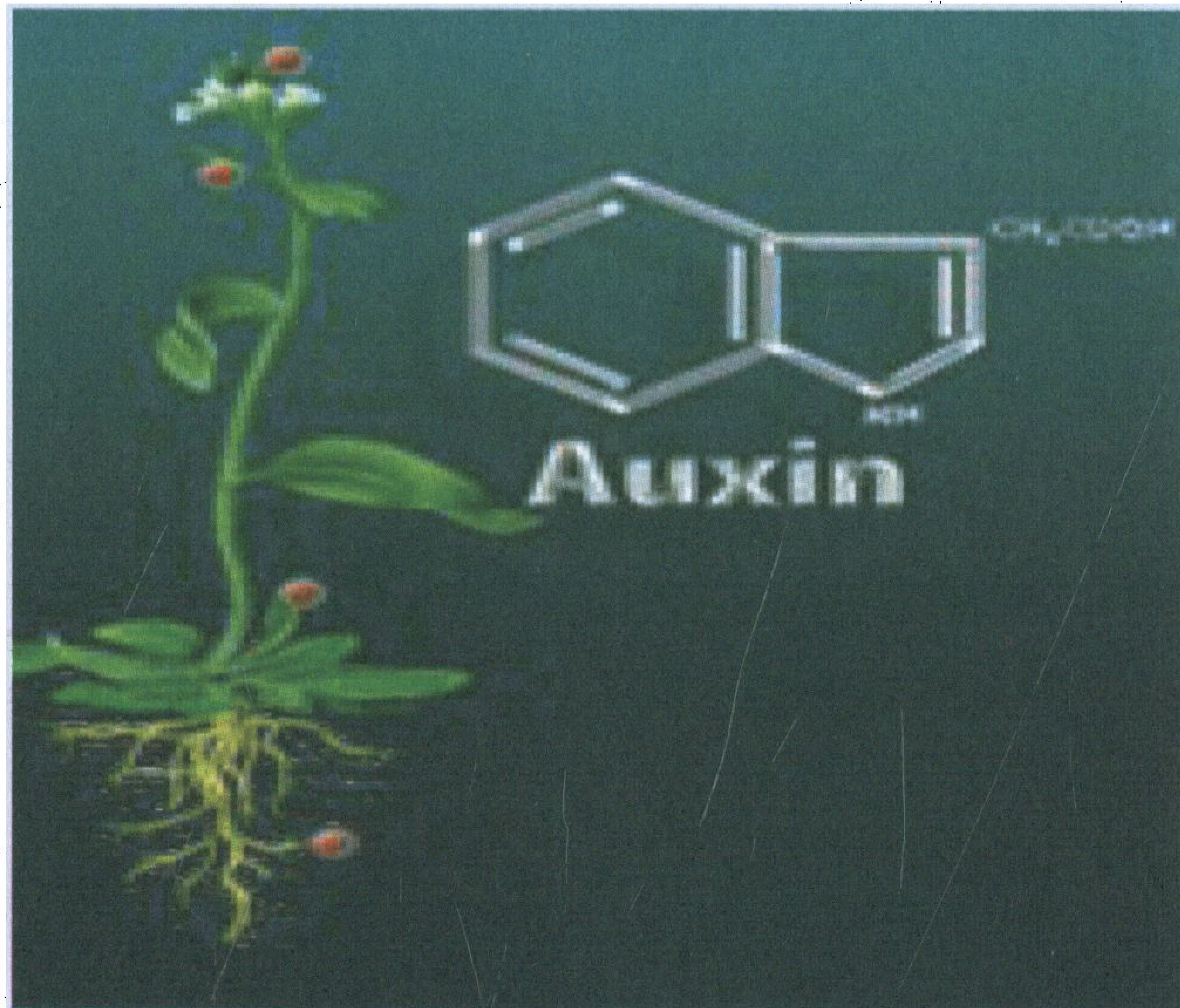
www.infonet.biovision.org- Images for soyabean



شكل (2) الاصفرار والموت الموضعي للنسيج في نبات الفاصوليا المسبب عن الفيزيولوتوكسين في نبات الفاصوليا



شكل (3) الاندول حامض الخليك وتأثيرة فى النبات
http:/digicoll.library.wisc.edu/science/data/ima



Indol acetic acid اندول حامض الخليك
http:/www.rz.uni.-karlsruhe.de

شكل (4)



شكل (5) تأثير الاندول حامض الخليك فى النباتات الراقية

http:www.inra. fr/internet/produits /hp43/imag…



شكل (6) مرض النار الهائجة في نبات التبغ المسبب عن Tabtoxin

http:/www.forestryimag



شكل (8)

مرض لفحة النار فى نباتات التفاح والاجاص المسبب عن سم الاميلوفورين
www.padil.gov.au/compare Images.aspx?pestl...



شكل (7) مرض لفحة الهالة في نبات الفاصوليا المسبب عن بكتيريا
Pseudomonas syringae pv *phaseolicola*
www.plant Management network.org/.../2007/beans

الفصل الرابع

4

ميكانيكية فعل السموم

Mechanism Of Toxins Action

1. المداخل التجريبية

Experimental Approaches

تمهيد

إن الأعراض المرئية المرافقة لفعل السموم المختلفة في النبات هي الاصفرار (chlorosis)، الذبول (wilting) والموت الموضعي للنسيج (necrosis). والتفسير الوحيد لهذا هو ان الخلايا النباتية، على العكس من الخلايا الحيوانية، لها استجابة ذاتية محدودة لفعل السموم toxicants (Durbin, 1991).

تمتلك الحيوانات أعضاء وأنسجة متخصصة جداً، وان أي عجز في الأداء الوظيفي المألوف ممكن تشخيصه بسهولة اعتماداً على الإعراض البايوكيميائية أو الابتعاد عن السلوك الصحيح، وهذا يختلف عن حالة الاختلال الوظيفي في البنات. فالنباتات لها تخصص خلوي أو نسيجي محدود جداً. وعليه فلها قابليه محدودة للتعبير المرئي عن التلف وكثيراً ما يقود التلف الأولي المسبب عن سموم مختلفة إلى تلف ثانوي وبدوره يقود إلى أعراض مرئية متشابهة جوهرياً فان كل الأنسجة النباتية تمتلك مجموعة أنظمة، بايوكيميائية أساسية وفيها تجري مجموعة متكاملة من *الأنشطة* الايضية المتخصصة المحدودة عموماً بالخزن، النقل وعملية التركيب الضوئي.

2. ميكانيكية فعل السموم

Mechanism Of Toxin Action

أ- الاصفرار Chlorosis

هذا العارض Symptom العادي أو المألوف يحفّز بواسطة عدد من السموم. على سبيل المثال :

أولاً: الفيزيولوتوكسين Phaseolotoxin المنتج من بكتيريا *pv. syringae pv. phaseolicola* المسؤولة عن تكوين هالات صفراء (Chlorosis haloes) على أوراق نبات الفاصوليا. يسبب الفيزيولوتوكسين تثبيط لإنزيم الاورنثين كارباميل ترانسفيريس [Ornithine-carbamyl transferase (OCT)] الذي يحفز بناء السترولين (Citrulline) من الاورنثين وفوسفات الكارباميل (Carbamyl phosphate) .

الدليل على ان الفيزيولوتوكسين ينتج في المرض يأتي من الملاحظات حول الطفرات غير المنتجة لسم البكتيريا *pv. phaseolicola* والتي لا تسبب اصفراراً (Chlorosis) على الرغم من أنها تنمو في نسيج المضيف (Patil *et al.*, 1974). تثبيط انزيم OCT يبدو على انه الفعل الأولي للسم على النبات لان إضافة الفيزيولوتوكسين والسترولين، وليس اورنثين، في نفس الوقت يمنع ظهور الأعراض. وحديثاً اقترح كل من Smith و Rubery (1982) بان الاصفرار المتسبب عن الفيزيولوتوكسين هو بسبب تثبيط بناء الكلوروفيل وليس بسبب تسريع تكسير الكلوروفيل الناتج عن قلة أو فقدان الحوامض الامينية.

ثانياً: الرايزوبيتوكسين Rhizobitoxin المنتج من بعض سلالات بكتيريا الـ *Rhizobium japonicum* المثبتة للنتروجين في العقد الجذرية لفول الصويا. يمتاز هذا السم بأنه يسبب الاصفرار في البادرات الصغيرة (Seedlings) للعديد من النباتات، فهو من السموم غير الخاصة (Non specific) في إصابتها لمضيف معين

(Owens & Wright, 1965). التجارب الأولية مع بكتيريا Salmonella typhimurium أشارت إلى تداخل هذا السم مع *الأنشطة* الايضية للسستوثايونين (Cystathionine)، (Owens *et al.,* 1968).

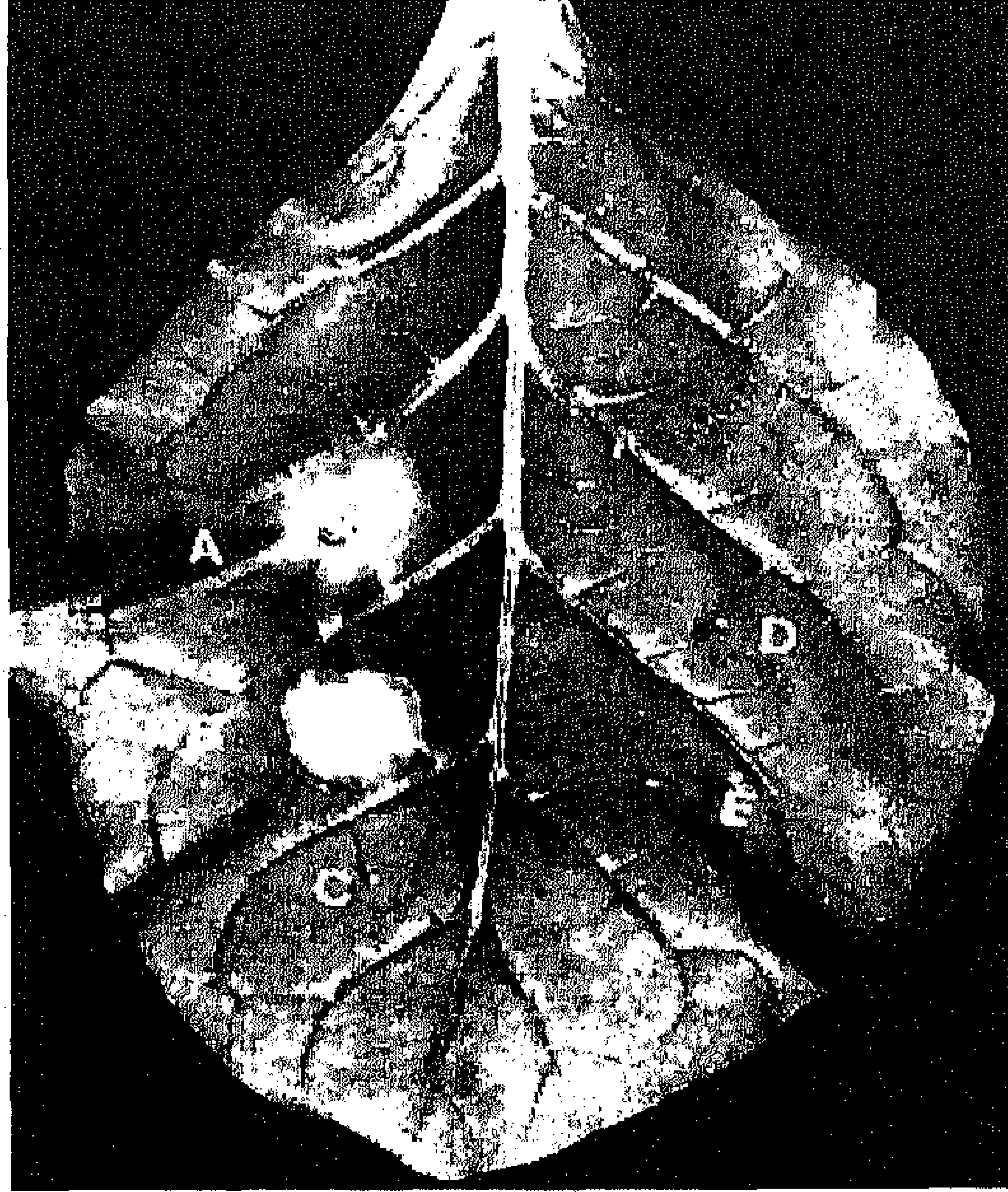
بعد ذلك، اثبت بان السم يثبط بصورة غير عكسية *نشاط* إنزيم بيتا – 4
سستوثايونيس (B-cystathionase) النقي المستخلص من السبانيغ. وبذلك يمنع تكوين الحامض الاميني المثايونين (Methionine). وهذا يشير إلى ان أعراض الاصفرار في فول الصويا هو بسبب عدم قابلية النبات على تكوين المثايونين.

تشير التقارير الأخرى إلى ان الرايزبتوكسين يثبط بصورة غير عكسية إنتاج الاثلين (Ethylene) في عدد من أنسجة النبات (Owens *et al.,* 1971).

ثالثاً: ان الصفة المميزة لمرض النار الهائجة (Wildfire disease) المتسبب عن التابتوكسين، هي بقع صفراء دائرية متميزة ومحددة وتحيط ببقع مركزية بنية اللون تمثل مناطق موت موضعي للنسيج (شكل 4–1 ، شكل 4–2)، على الرغم من ان السم لم يعزل من النبات المصاب، إلاّ ان هناك شواهد غير مباشرة تشير إلى دور السم في المرض. مثال ذلك حدوث نفس التغيرات الفيزيولوجية في النبات عند حقن السم أو إصابته بالبكتيريا المنتجة له. كما إن العزلات الغير منتجة للسم من بكتيريا *pv. tabaci* لا تسبب اصفراراً في النبات على الرغم من نموها في النسيج المصاب (Turner & Taha, 1984).

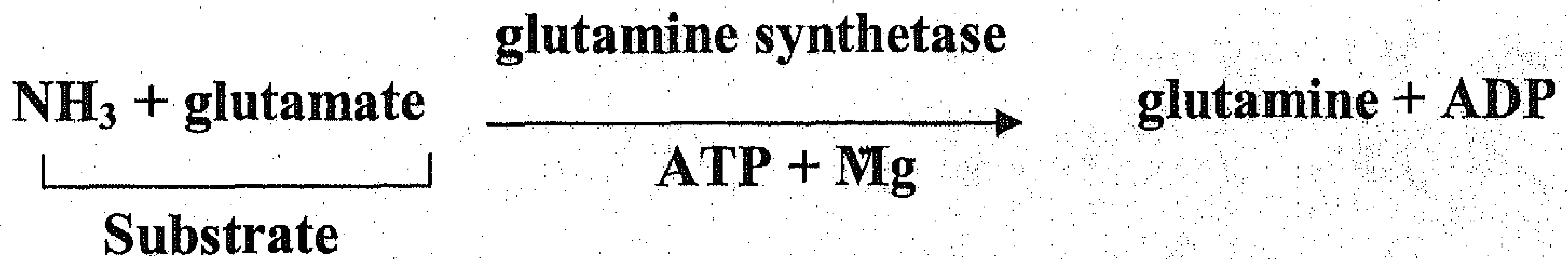
الفعل الأولي للسم هو تثبيط انزيم بناء الجلوتامين (Glutamine)، الجلوتامين سنثتيس (Glutamine synthetase) في النبات (Sinden & Durbin 1968; Turner, 1981). والمدهش ان التابتوكسين النقي لا يثبط انزيم الجلوتامين سنثتيس النقي جداً، خارج الجسم الحي *in vitro*. على اية حال فان هذا الإنزيم يثبط، خارج الجسم الحي *In vitro*، بواسطة التابتوكسينين بيتا لاكتام (Tabtoxinine-B-Lactam)

والمحـــرر مـن تحليــل التابتــوكسيــن بواسطـــة الإنزيمـات المحللــة للبتيـدات (Uchytil & Durbin 1980; Turner & Taha, 1984).



شكل 4-1 : نبات تبغ مصاب بيكتيريا الـ *Pseudomonase syringae pv. tabaci*
تظهر البقع الصفراء المتميزة تحيط بالبقع البنية المركزية والتي تمثل مناطق موت موضعي للنسيج (Necrosis)

يلعب إنزيم الجلوتامين سـنثتيس دوراً مهمـاً مركزيـاً في الأنـشطة الايـضية للنبات فهو يمثل الطريق الوحيـد لتمثيـل الـنتروجين غـير العـضوي (NH_3) إلى حامض أميني جلوتامين (Glutamine).



$$\underbrace{NH_3 + \text{glutamate}}_{\text{Substrate}} \xrightarrow[\text{ATP + Mg}]{\text{glutamine synthetase}} \text{glutamine + ADP}$$

الوصـــــول إلى تركيـــــز ســــــام بحيــــــث يـــــسبب فـــــصل (Uncouplephotophoshorylation) عملية الفسفرة الـضوئية (Phosphorylation) عن التركيب الضوئي (Photosynthesis) (Miflin & Lea, 1976). كما انه يعمـل علـى إعـادة تثبيـت الامونيـا المتحـررة مـن دورة الـنتروجين التنفـسية الـضوئية (Photorespiratory nitrogen cycle) ، حيث تحرر الامونيا من خلال تحويـل، 2 مول من الجلايسين (Glycine) إلى 1 مول من السيرين (Serine) والأمونيا وثاني اوكسيد الكربون.

كذلك الجلوتامين، ناتج هذا الإنزيم، يعمـل علـى إعطـاء مجموعـة الاميـد (Amide group) لتكوين مواد مهمـة جـداً كفوسـفات الكارباميـل (Carbamyl phosphate)، الادينوسـين (Adenosine)، التربتوفـان (Tryptophane)، أحمـاض الادنيلـك والـستيديلك (Adenylic & cytidylic acide)، الكلوكـوزامين – 6 – فوسـفات (Glucose amine - 6- phosphate)، الهـستدين (Histidine) ومركبـات مهمة أخرى.

ان الأذى أو التلف (الاصفرار) الناتج عن التابتوكسين قد أعزيَ إلى تجمـع اوتـراكم الامونيـا إلى مـستوى سـام (Toxic level) (Sinden & Durbin, 1968) كذلك من الممكن ان تكون هذه الحالات المرضية هي بسبب قلـة المـواد المـشتقة من الجلوتامين (Durbin, 1971). من المحتمل عندما يضعف بناء البروتين فان بناء صبغات الكاروتنويد (Carotenoid) ربما يتأثر وهذا يؤدي إلى تحلل الكلوروفيل (Chlorophyll) في الضوء كنتيجة لفقدان الحمايـة الـضوئية (photo protection) الجهزة من قبل الكاروتنويـد (Moreland, 1980). وعلـى أيـة حـال فـان سـبب الاصفرار غير معروف بصورة قاطعة.

وقد وضح Turner و Debbage (1982) بان نشوء وتطور أعراض المرض الناتجة عن التابتوكسين (Tabtoxin) وتكوين الامونيـا تعتمـد علـى الـضوء وان

الامونيا المتراكمة في الأنسجة المعاملة بالتابتوكسين مشتقة من دورة النتروجين التنفسية الضوئية. ان استنتاجهما هذا متأتٍ من ان الظروف التي تمنع دورة التنفس الضوئي (Photo respiration) تمنع كذلك تجمع الامونيا.

ان أهمية دورة التنفس الضوئي لسمّية التابتوكسين تلاحظ من اختفاء الأعراض عندما يوضع النبات تحت ظروف تمنع هذه الدورة في الظلام أو وجود CO_2 (Turner & Debbage,1982).

من المحتمل بان أي اضطراب في دورة التنفس الضوئي ناتج عن التابتوكسين (نتيجة لتثبيط إنزيم الكلوتامين سنثيتيس) في خلايا النبات، يعبر عنه كاصفرار وموت موضعي للنسيج (Turner & Taha, 1986; R. Taha ph. D thesis, 1984).

وعلى الرغم من ان بعض الدراسات أشارت إلى ان التابتوكسين بسبب تثبيط إنزيم ريبولوز فوسفات كربوكسيلس (Ribulose diphosphate carboxylase)، خارج جسم النبات *in vitro*، الأنزيم المثبت لثاني اوكسيد الكربون في دورة التركيب الضوئي (Crosthwaite & Sheen, 1979) فان هذا لا يحدث داخل جسم النبات *in vivo* (R. Taha Ph.D thesis,1984).

ب- الذبول Wilting.

تحدث أعراض الذبول عندما يفوق معدل النتح معدل الماء المجهز لنسيج النتح، أو عندما تصبح خلايا البلازماليما (Plasmalemma) ناضحة بصورة حرة. نتيجة لذلك تتسرب المواد المذابة في السائل الخلوي إلى الحد الذي ينخفض فيه الضغط التنافذي بصورة معنوية.

عدد من السموم تجعل خلايا المضيف تصبح ناضحة بصورة حرة، ونتيجة لذلك يصبح النسيج مترهلاً وذابلاً (Turner, 1984).

أولا: الاميلوفورين Amylovorin.

تنتج بكتيريا Erwinia amylovora مادة متعددة السكريات سمية (Toxic polysaccharide)، تدعى الأميلوفورين (amylovorin)، (Goodman et
4 al.,1974) المنتجة لأعراض الذبول لمرض لفحة النار (Fire blight) في معظم فصيلة الورديات (Rosaceae) ، وتشمل التفاح والأجاص . لقد وضح بان الاميلوفورين يسبب انسداد لسريان الماء خلال مقاطع الساق للنبات المضيف (Sjulin &Beer, 1978) ويسبب قلة في الماء المجهز إلى نسيج النتح (Transpiring tissues) وبالتالي ينتج أعراض الذبول. إن النشاط البيولوجي للاميلوفورين من المحتمل ان تكون بسبب حقيقة كونه ذا وزن جزيئي كبير ($M.W\ 1.65x10^5$) وبالتالي فانه يعمل ميكانيكياً على منع سريان الماء خلال أوعية النبات الناقلة للماء إلى الأوراق.

ثانياً: الجليكوببتيد Glycopeptide.

وضح Spencer و Gorin (1961) بان الراشح البكتيري غير النقي لبكتيريا Corynebacterium sepedonicum ولبكتيريا C. insidiosum يحتوي على مواد من نوع الجليكوببتيد التي تحفز الذبول (Wilt - inducing glycopeptide).

المركب السام النقي المحصل عليه من مزرعة C. sepedonicum له وزن جزيئي مقداره $2.14\ X10^4$ دالتون والذي هو عبارة عن جليكوببتيد متفرع كما وضح بجهاز الرنين النووي المغناطيسي (Strobel, 1967) وتمكن كذلك من عزل السم من النبات المصاب ووجده مشابه تماماً للسم المعزول من المزرعة البكتيرية.

قدم Strobel و Hess (1968) شواهد اشتراك السم في حدوث اختلال وظيفي في غشاء الخلية وبالتالي حدوث تسرب للالكتروليت (Electrolyte).

الجليكوببتيــــد المنـــتج مـــن C. insidiosum ذو وزن جزيئــــي ($Mol.\ wt\ 5x10^6$) دالتون والذي يسبب الـذبول في نبـات البرسـيم (Alfa alfa). يسبب السم قلة في سريان الماء خـلال أوعيـة الـساق. يظهـر الـذبول في الـساق المحقون بحوالي 2 مايكروغرام من الجليكوببتيد.

شواهد أخرى تشير إلى ان الجليكوببتيد يسبب انـسداد ومنـع سـريان المـاء خلال الساق دون ان يؤثر على نفاذية (Permeability) الغشاء، حيث لوحظ بان الساق يشفى ويعـود سـريان المـاء اعتيادياً عنـدما يقطـع جـزء الـساق المعامـل بالجليكوببتيد (Van Alfen & Turner, 1975).

جـ- الموت الموضعي للنسيج Necrosis.

هو العـارض الأقـل تميـزاً مـن بقيـة الأعـراض حيـث ان مـوت الخلايـا، الأنسجة، الأعضاء أو النبات كله يحدث في معظم أمراض النبات.

عدد كبير من السموم المسببة للموت الموضعي للنسيج قد شخصت.

أولا: السبرنجيومايسين Syringomycin.

المنتج من قبل Ps. syringae. له تأثير على الأغشية الخلوية والـذي افـترض بان ذلك هو فعل السم الأولي على النبات بسبب ما يلي :

1) الخلايا المعاملة بالسم تظهر تحللاً سريعاً للأغشية الخلوية يشابه تأثير المطهرات.

2) الخلايا المعاملة بالسم المعلم بـالكربون 14 (^{14}C - toxin) تظهـر تـراكم المادة المشعة في أغشية خلايا البلازماليما والغشاء النووي.

3) تأثير السم يمكـن عكـسه بواسـطة الـستيرولات (Sterols) والـدهنيات المفسفرة Phospholipids (Backman & De Vay, 1971).

ثانياً: في 1980 وصف Buchanan و Starr مادة سامة عزلت بحالة شبه نقية من مزرعة معلق خلايا الأجاص الملقحة ببكتيريا E. amylovora. وهذه المادة، لا تشبه الاميلوفورين، حيث تحفز الموت الموضعي للنسيج الشديد جداً، وتسبب ذبولاً قليلاً لنباتات الأجاص الصغيرة. وعند إضافتها إلى مزروع معلق خلايا الأجاص الطبيعي تسبب عرقلة النمو. وقد أشار الباحثان إلى ان هذه المادة تعزل من مزرعة معلق خلايا الأجاص الملقحة بالسلالة المرضية للبكتيريا ولا تعزل من المزروع الملقح بالسلالة غير المرضية إطلاقا على أية حال فان الدراسة الحديثة تشير إلى عدم التمكن من عزل هذه المادة ثانيةً. ناقش باحثون آخرون هذه النتيجة السلبية بعدم استبعاد الوجود المحتمل لهذه المادة السامة والتي لم يتم عزلها بسبب طريقة العزل غير الملائمة.

4

3. بحوث مستقبلية.

إن مناقشة البحوث المستقبلية يجب ان تراجع من وجهة نظر تخمينية. إن تحفيز تكوين اطر لتجارب قادمة، يركز كما تشير الدراسات، على السموم الخاصة بمضيف معين وذلك :

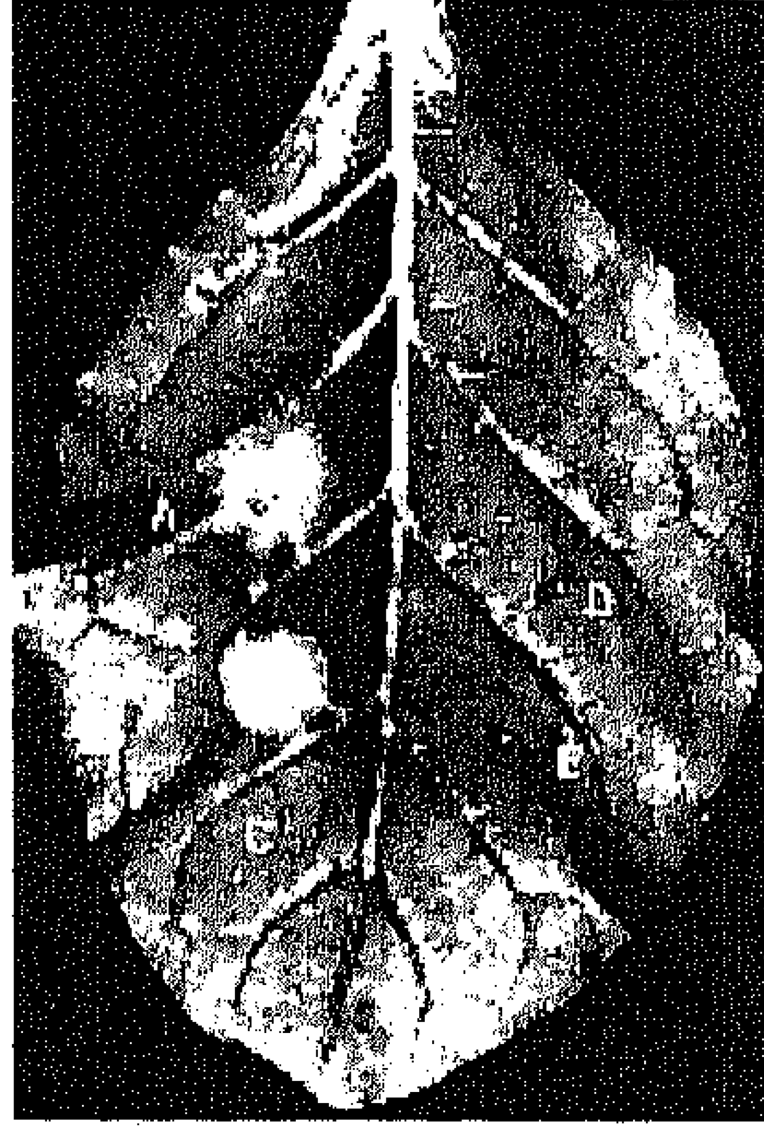
أ- لكون السم هو العامل الوحيد لإحداث المرض.

ب- ظهور مشاكل تجريبية بواسطة هذه السموم.

ج- البحوث الحديثة لها اهتمامات خاصة بهذه السموم.

إلاّ انه ليس هناك ما يبرر إعطاء أسبقية أو أهمية لدراسة فعل ميكانيكية السموم الخاصة عن السموم الغير خاصة فهناك سموم غير خاصة إلاّ أنها تمثل العامل الوحيد أو الأساسي لأحداث المرض، وعلى سبيل المثال، التابتوكسين الذي يمثل العامل الوحيد المحدد لمرضية بكتيريا الـ pv. tabaci (ATCC 11528). ان هذا الاستنتاج يعتمد على ملاحظة الطفرات غير المكونة للسم لبكتيريا pv. tabaci (ATCC 11528) بكونها لا تسبب المرض في النبات المضيف (التبغ)، كما يشاهد

بانعدام الأعراض المرضية كلياً (شكل 4-2) في النسيج النباتي على الرغم من ان البكتيريا تستعمر ذلك النسيج (Turner &Taha, 1984) ، (انظر الفصل السادس).



شكل 4-2 : الأعراض على ورقة نبات التبغ الملقحة بـ Pseudomonas spp التابتوكسين

قطرات (5 مايكرولتر) تحتوي على خلايا بكتيرية مغسولة (10^4) أو على التابتوكسين (18 نانامول) وضعت على جرح وخز بالدبوس (Pin – prick wound) ووضع النبات في البيت الزجاجي بدرجة رطوبة 100٪ لمدة 14 يوم.

الصورة تظهر الأعراض النموذجية الناتجة عن التلقيح بـ

A = النوع الوحشي P. syringae pv. tabaci

B = التابتوكسين

C = طفرة غير مولدة للسم $Pv.\ tabaci\ tox^-$

D = P. syringae pv. syringae

E = P. putida

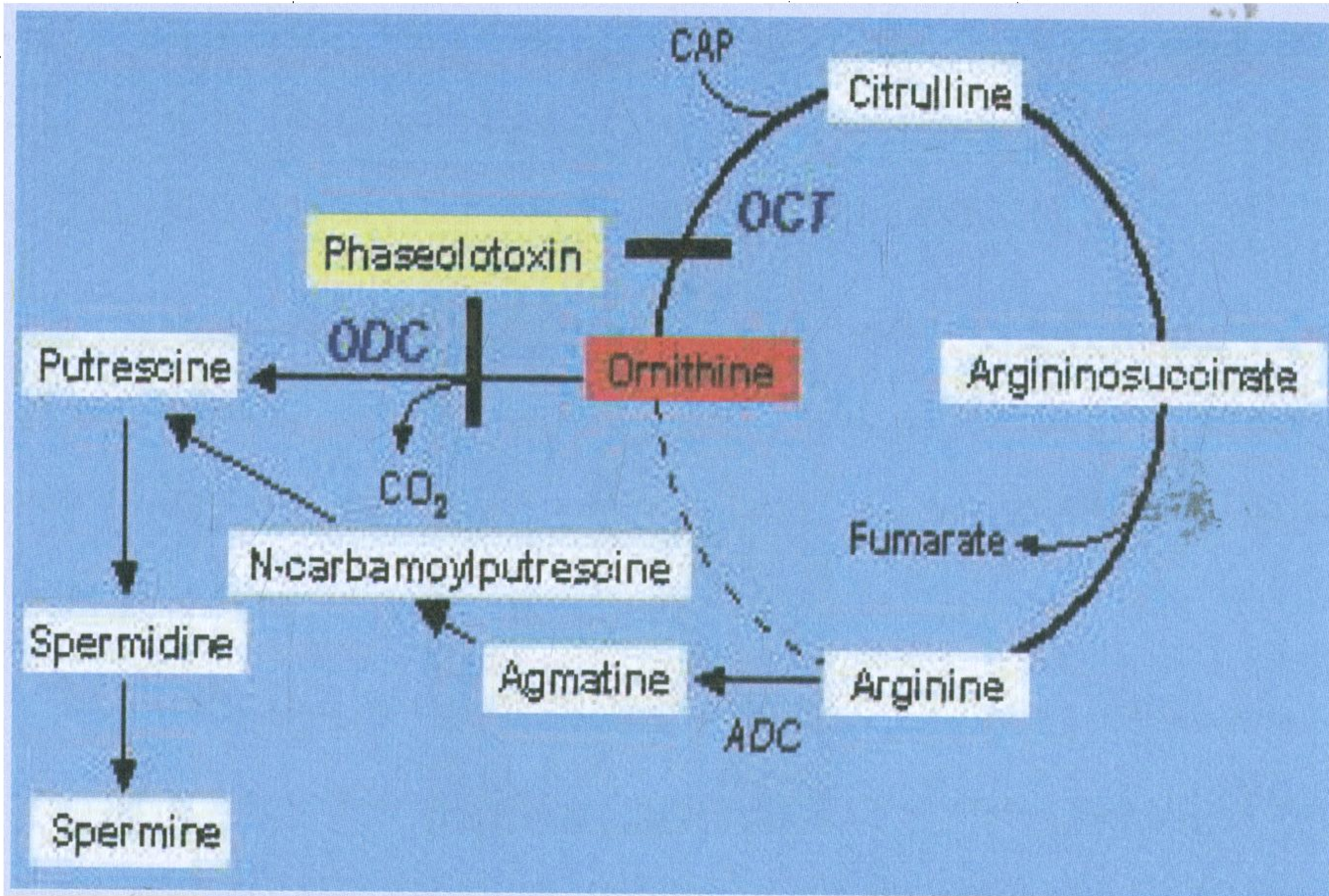
F = طفرة أخرى غير مولدة للسم $Pv.\ tabaci\ tox^-$

أما فيما يتعلق بالمشاكل التجريبية المسلطة بواسطة هذه السموم، فهناك أمثلة على سموم غير خاصة تسلط مشاكل معقدة تحتاج إلى وضع الأسس الصحيحة لحلها. فمثلاً تحديد الكائن الحي التجريبي الصحيح يعتبر من الأمور الهامة لفهم ميكانيكية المرض، ولعل الدراسة التي أجريت حول تأثير التابتوكسين على طحلب **Chlorella vulgaris** خير مثال على ذلك، حيث أشارت الدراسة على

ضرورة احتواء الكائن الحي التجريبي على الهدف الحساس الذي يعمل عليه السم، بشرط ان يكون هذا الهدف ذا أهمية أساسية لتسير *الأنشطة* الايضية ودون ان يكون له عامل بديل (**R. Taha Ph.D thesis, 1984**).

وقد يستخدم الباحثون أحيانا نماذج من الكائنات الحية يسهل التعامل معها دون التأكد من احتواء هذه النماذج على الطريق الايضي (Metabolic pathway) التي يؤثر عليه السم أو وجود بديل يعوض عنه في حالة تثبيطه بواسطة ذلك السم.

أما ما يتعلق باهتمام البحوث الحديثة بالسموم الخاصة فهذا لا يعني عدم وجود اهتمامات بالسموم غير الخاصة خصوصاً وان الأخيرة معظمها من أصل بكتيري، وتزخر المراجع العلمية بدراسات وبحوث عن سموم البكتيريا.



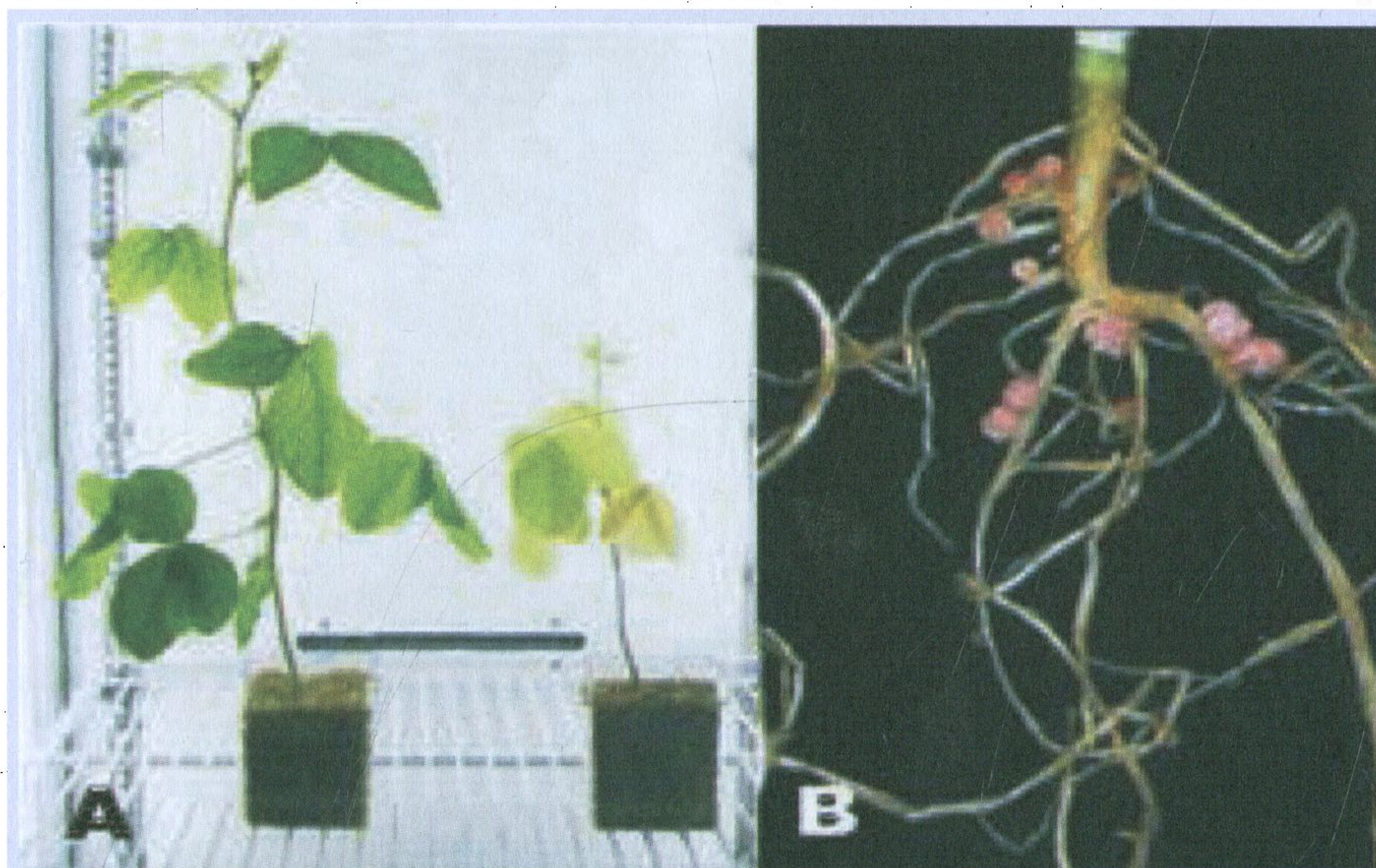
شكل (1) مخطط يوضح دور سم الفيزيولوتوكسين في تثبيط أنزيم
ornithine carbamyl tranferase
www.sut.acth/e-texts/agri/myweb2/link315.htm



شكل (2) الاصفرار على أوراق نبات الفاصولياء بسبب الفيزيولوتوكسين
http:/www.plantmanagement network.org

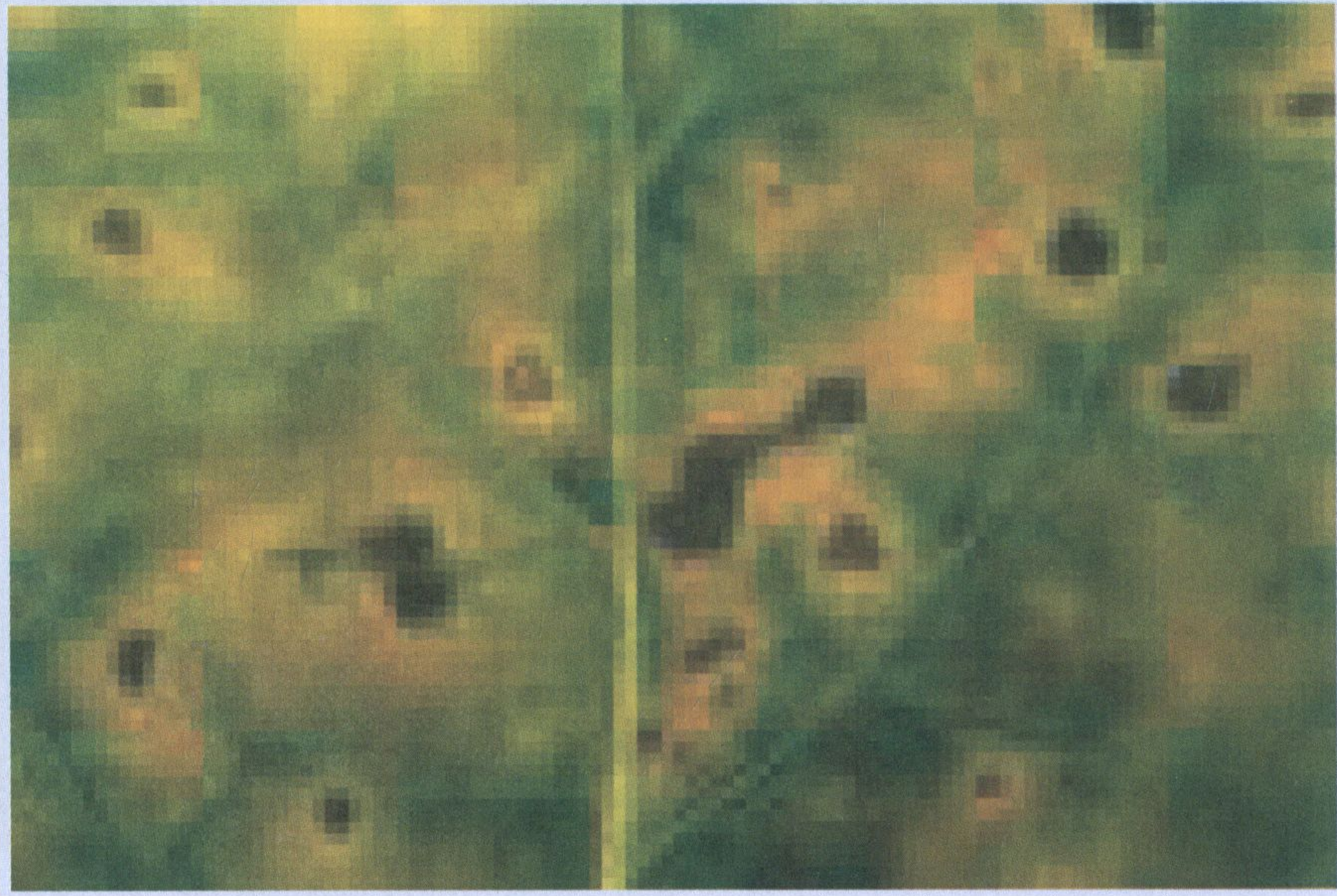


شكل (3) الهالات الصفراء المحيطة بمناطق الموت الموضعى للنسيج بسبب سم الفيزيولوتوكسين في نبات الفاصولياءhttp:/www.plantmanagement network.org



شكل (4) العقد الجذرية في نبات فول الصويا - نبات مصاب بسم النبات السليم

الرايزوبتوكسين لاحظ الاصفرار http:/.../genomic/cluster/html



شكل (5) التأثير السام للتابتوكسين على نبات التبغ لاحظ البقع البنية necrosis المحاطة بالهالات الصفراء chlorosis (www.sut.ac.th/e-texts/agri/myweb2/link314.htm)



شكل (6) إصابة نباتات التفاح والاجاص ببكتيريا Erwinia amylovora المنتجة للاميلوفورين وما تسببه من خسائر فادحة في حقول الفواكة .لاحظ ذبول الأوراق وتيبس السيقان http:/www.ppdl.purdue.edu/ppdl/images fire blight



شكل (7) حقل مصاب ببكتيريا Pseudomonas syringae pv syringae
لاحظ عارض الموت الموضعى فى الأوراق
www.inra.fr/hyp3/images



شكل (8) الموت الموضعي necrosis للأوراق المسبب عن بكتيريا Ps.syringae pv syringae
http/www.foresty images

الفصل الخامس

5 الأنشطة الأيضية لبناء وانحلال السموم

Metabolic Activities Of Toxins Synthesis And Degradation

1. مقدمة

Introduction

في الواقع، ان فهمنا لبناء السموم ومصيرها في النباتات المريضة لا تزال في المراحل الاولى والسبب الاعظم، في ذلك يعود الى فقدان المعلومات المضبوطة حول التركيب الكيميائي للسموم اضافة الى التعقيدات التالية (1) صعوبة تنقية عدد كبير من السموم تنقية تامة، (2) تكوّن السموم عادة جزءً صغيراً جداً من المحتوى الكلي للكربون والنتروجين في المزرعة، وعليه فان استخدام تقنية النظائر المشعة (Radiolabeling Technique) يمكن تطبيقهُ بصعوبة عدا حالة السموم الحاوية على ذرات الكبريت والفسفور (انظر الفصل الثالث)، (3) السموم ممكن ان تكون غير ثابته داخل الجسم الحي / أو خارجه in vivo and / or in vitro، السموم عموماً تكون فعالة بتراكيز قليلة أو واطئة جداً ($<10^{-6}$ M).

وهناك أسباب عديدة تعلل اهمية معرفة بناء والانحلال السموم. وهذه الاسباب تذهب مباشرة الى المشاكل المركزية في علم امراض النبات وهي نشوء المرض، والمقاومة (Resistance). وحيث ان المقاومة أو الحساسية لهذه السموم تتطابق مباشرة مع المقاومة أو التعرض لإصابة (Susceptibility) الكائن الممرض ويطبق هذا على السموم التي تصيب مضيفاً معيناً (خاصاً) وكذلك السموم التي ليس لها مضيف خاص لاصابته مثل التابتوكسين.

ان هـذه المعرفـة تقـدم امكانيـة التزويـد بالمعلومـات الـتي يمكـن تطبيقهـا لاستنباط اجراءات السيطرة على الامراض وفهم نمو وتطور النباتات.

2. البناء الحيوي للسموم
Biosynthesis of toxins

ان البناء الحيوي للسموم البكتيرية عموماً يتبع طـرق البنـاء المثبتـة سـابقاً (انظر الفصل الثالث). ان الاوزان الجزئية للسموم تشير الى استخدام الانزيمـات في بنائها. اضافة الى هذا فهناك عدد كبير من الاحماض الامينيـة غـير الاعتياديـة و/ أو مشتقاتها وجدت الان في سموم معينة وهي بذلك لا يمكن فهم بنائها على اساس معلومات الشفرة الوراثية التقليدية. وعلى اية حال، في الوقت الحاضر لا يوجد هناك دليل مباشر حـول اشـتراك الرسـول ر ن ا (Messenger R N A) أو الرايبوزوم (ر ن ا) (Ribosomal R N A) في بناء السموم على الرغم من وجـود سم (سيراتوألمين Cerato-Ulmin) المسئول عن الذبول في نبات الـدردار الابـيض (White Elms)، هو عبارة عـن بـروتين صـغير ذي وزن جزيئـي 10000 دالتـون ويحتوي على 128 حامض اميني. ان وجود سم بهذا المستوى من التعقيـد يحتـاج الى مشاركة نظامي الاستنساخ والترجمة.

كذلك ليس من الواضح فيما اذا كانت هذه السموم اساساً كنواتج نهائيـة للأنشطة الايـضية الثانويـة(Secondary Metabolism Activities)، أو ربمـا تقـوم بأعمال خلوية للكائن الحي المنتج لها. ولعدة اعتبارات فاننا يجب ان نعتمد علـى مقارنة السموم مع المضادات الحيوية أو سموم الفطريـات (Mycotoxins) حيـث تكون لهذه المركبات صفات مـشتركة عامـة مـع سمـوم البكتيريـا المـؤثرة علـى النباتات. الأحياء الجهرية عموماً تبين فصائل من مواد متقاربة الى حدٍ بعيد، على سبيل المثال في ببتيدات المضادات الحيوية حيث يتم استبدال حامض اميني بـاخر

مقارب له في التركيب. وكمثال على ذلك في دراسة السموم المؤثرة على النباتات، التابتوكسين والفيزيولوكسين. التابتوكسين منتج من قبل Pseudomonas syringae Pv. tabaci يحتوي إما على الحامض الاميني الثريونين (Threonine) أو السيرين (Serine) مرتبط عبر اصرة ببتيدية الى الحامض الاميني 5
للتابتوكسنين_بيتا_لاكتام (Tabtoxinine-B-lactam). الفيزيولوتوكسين يوجد على شكل نظيرين يحتوي احدها على الحامض الاميني السيرين ويحل الحامض الاميني الالنين (Alanine) محل السيرين في النظير الاخر.

وفي كل الأحوال فان هذه النظائر لها نفس الفعالية البيولوجية وتوجد معاً في راشح مزرعة البكتيريا المنتجة للسم.

في معظم الحالات ليس من المعروف فيما اذا كانت هذه المركبات تمثل نظائر، مركبات وسطية في عملية بناء السم، كنواتج لانحلال السم الواحد أو أنها مركبات مختلفة عن بعضها كلياً.

أن تنظيم الفعاليات الايضية للبناء الحيوي للسم لم يدرس لسبب واضح جداً، وهو اننا نمتلك معلومات وصفية عامة عن بناء السم تتعلق بمنحنى النمو (Growth Curve) وتغير ظروف المزرعة البكتيري فقط (راجع Shaw, 1981).

وتشير الدراسات الى وجود مُتغيِّرية بين عزلات الكائن الحي المنتج للسم فيما يتعلق بانتاج السم، ولو ان بعض الحالات ليس من المعروف فيما اذا كان سبب هذه المتغيرية يعود الى معدل النمو للعزلة أو بسبب الاختلافات الأساسية في مقدار سرعة بناء السم لكل وحدة مقارنة (مثال ذلك، ملغم بروتين). ان تركيز وفعالية السموم دائماً تقاس في الوسط المغذي للمزرعة، عليه يجب ان نتوقع العوامل المعقدة المحتملة من اجراء مثل هذه الاختبارات (انظر الفصل السابع).

3. انحلال السموم

Degradation Of Toxins

مصير السموم في النباتات المريضة بعد ان يُحرر من قبل الكائن الممرض يخضع لعدة احتمالات منها (أ) يفترض ان هذه السموم تكون في شكلها الكيميائي الفعال بيولوجياً، وطبيعياً سوف يتفاعل مع المضيف في موقع أو مواقع الفعل الأولي، (ب) ربما ان السموم لا يمكنها الوصول الى موقع فعلها، ولكنها تنتشر أو تُنقل بصورة فعالة الى مكان اخر لايمثل جزءاً فعالاً في المضيف، (ج) من الممكن ان تحور هذه السموم بالوسائل الكيميائية أو الكيموحياتية Biochemical، وقد تشترك إنزيمات المضيف أو الكائن الممرض في هذا التحوير.

وقد لاحظ باحثون عديدون ان السموم التي تكون بحالة نقاوة تامة تكون اقل ثباتاً من السموم الخام أو الملوثة بمواد اخرى. المواد الملوثة يمكنها ان تثبت السموم وعلى سبيل المثال الايونات الموجبة الثنائية التكافؤ معروفة بتثبتها للبروتينات. في النباتات المريضة ربما تكون هناك حالات تثبيت مناسبة، مثل درجة الحموضة، العوامل المساعدة، الارتباط بموقع التفاعل أو العوامل الواقية (Protectant) غير الخاصة (مثل مواد SH).

والسؤال الذي يطرح نفسه هو أن السموم تنشأ من خلال اعادة الدورات من جديد (De novo) أو أن بعضها تشتق من انفلاق الجزيئات الكبيرة، كما هو الحال في العديد من الببتيدات الحيوانية والتي لها أنشطة فسيولوجية. من بين السموم المؤثرة على النبات، التابتوكسين، حيث يحتاج هذا السم الى معالجة خاصة، ففي النبات المريض هناك انزيمات (Peptidase Enzyme) لها القابلية على تحليل وتكسير الببتيدات وهي غير خاصة في عملها، تعمل هذه الانزيمات على فلق أو شق الثريونين أو السيرين محررة الجزء الفعال بيولوجياً تابتوكسنين_بيتا_لاكتام (Uchtil&Durbin, 1980; R.Taha-Ph.D thesis, 1984).

كذلك عند حقن تابتوكسين معلم C14 Labeled Tabtoxin في نبات صحي أو سليم، خلال فترة قصيرة يمكن الكشف عن تابتوكسنين-بيتا-لاكتام المعلم (C14-Labeled Tabtoxinine-B-Lactam). النباتات وأنواع جنس Pseudomonas Spp تمتلك الانزيمات المحللة للببتيدات وقادرة على تحليل التابتوكسين (Uchytil&Dnrbin, 1980).

5

طفرة من بكتيريا Salmonella typhimurium الفاقدة للانزيمات المكسرة للببتيدات (Miller, 1975) تكون مقاومة للتابتوكسين، وهذا بسبب فقدان قابليتها على تحليل الببتيد (التابتوكسين) الى جزئه السام أو النشط بيولوجياً (R. Taha. Ph.D. Thesis, 1984). ان تحليل التابتوكسين يعتبر ضروري لاظهار نشاطه البيولوجي.

نفس النتائج تنطبق على الفيزيولوتوكسين المنتج من Ps. Syringae pv. Phaseolicola (Burkh)، حيث يحلل هذا السم بفعل الانزيمات النباتية (Mitchell&Bieleski; 1977) ان ناتج تحليل هذا السم، الفوسفوسلفامل اورنثين (Phospho Sulfamyl Ornithine)، يثبط انزيم اورنثين كارباميل ترانسفيريس Orhithine Carbamy Transferase بصورة غير عكسية.

في حين الفيزيولوتوكسين بحد ذاته (N-Phospho sulfamyl ornithyl alanyl homoarginine) مثبط تنافسي (Competitive Inhibitor) ضعيف للانزيم اعلاه (Mitchell, 1984).

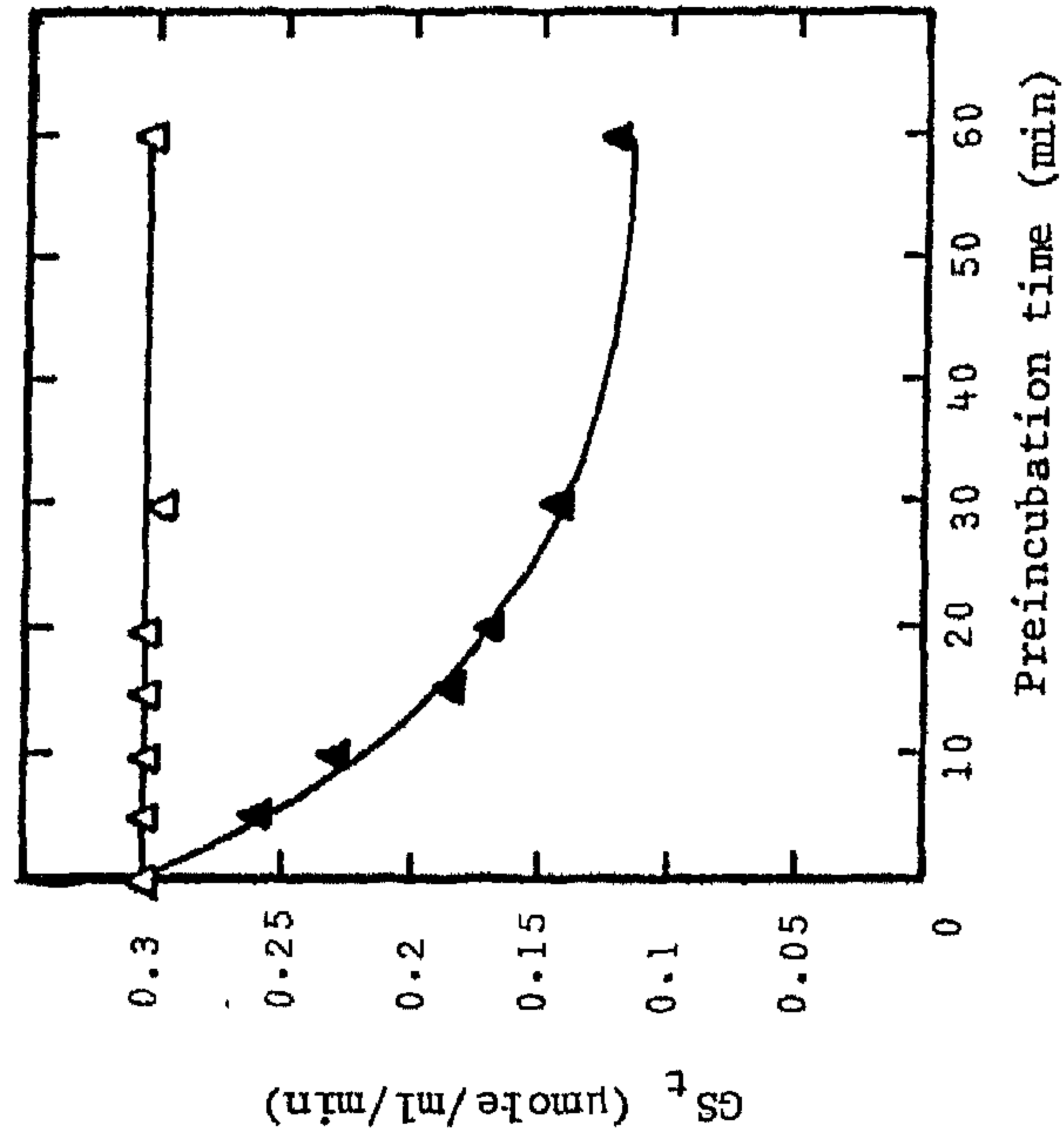
من السمات الممتعة لدراسة انحلال وبناء السموم هو ما يتعلق بمقاومة الكائن الحي للسم الذي ينتجه وخصوصاً إذا كان الكائن الحي يمتلك الهدف الحساس للسم. بعض الميكانيكية المحتملة لتفسير هذه المقاومة كما وضحها Demain (1974) هي (1) تحوير في القابلية المنفذية (Permeability) للخلايا (2) انحلال أو تحوير السم داخل الخلية (3) تغير في انجذاب السم نحو الهدف الحساس

(4) التقسيم الخلوي الى اجزاء مستقلة Compartmentalization (5) السيطرة على بناء السم في الخلية بميكانيكية التغذية الرجعية الغير المرتبطة بالموضع الفعال للانزيم (Allosteric Feed Back) (6) نواتج الفعاليات الايضية المبطلة لعمل السم (Tamari etal., 1967)، واخيراً (7) مجموعة العوامل السابقة.

في حالة التابتوكسين تكون عزلة Pv. tabaci (النوع البري Wild Type) غير حساسة للتابتوكسين أو للتابتوكسنين_بيتا_لاكتام، على الرغم من ان البكتيريا تمتلك انزيمات محللة للببتيدات (Peptidase Enzyme) (شكل 5-1) وانزيم الجلوتامين سنثيتس Glutamine synthetase الحساس للتابتوكسنين_بيتا_لاكتام (شكل 5-2) (R. Taha. Ph. D. Thesis 1984) وعليه فإن مقاومة هذه البكتيريا للسم المنتجة له يجب أن تكون لسبب آخر. تشير دراسة Durbin & Uchytil غير المنشورة إلا إن سبب المقاومة هو عدم قدرة بكتيريا Pv. Tabaci النوع البري على أخذ (up take) السم أو التابتوكسنين_بيتا_لاكتام. مقاومة بكتيريا pv. phaseolicola P. Syringae للفيزيولوتوكسين المنتجة له كما وضحها Staskawicz وجماعته (1980) هو ان بكتيريا Pv. phaseolicola تحتوي على انزيم الاورنثين كارباميل ترانسفيريس (Ornithine Carbamyl Transferase) الذي يكون غير حساس للفيزيولوتوكسين عندما تنمى البكتيريا بدرجة حرارة تسمح بإنتاج للفيزيولوتوكسين. ولكن عندما تنمى البكتيريا بدرجة أعلى لا تسمح بإنتاج للفيزيولوتوكسين، فان الانزيم المتكون يكون حساساً للسم. في حين فسر Ferguson وجماعته (1980) مقاومة بكتيريا pv.phaseolicola للسم بان السلالات المختلفة من البكتيريا تحتوي على الانزيم (اورنثين كارباميل ترانسفيريس) ذي درجات حساسية مختلفة للسم، تتراوح من حساسية كحساسية

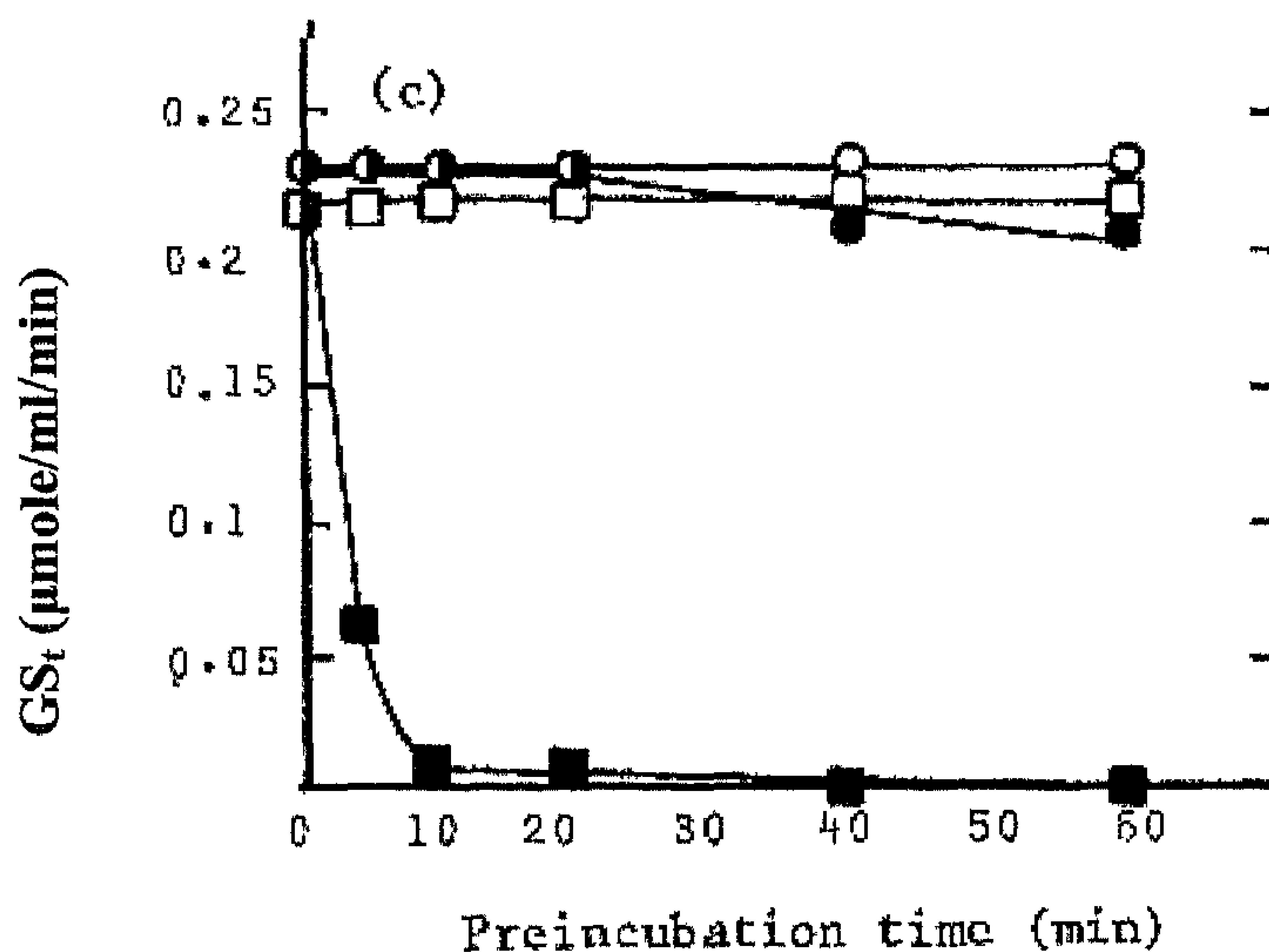
انزيم بكتيريا E. coli أو أنـزيم نبـات الفاصـوليا الى انـزيم يتـأثر قلـيلاً بـالتركيز العالي (150 µM) من السم.

في النبات يمكن ان تكون الأنشطة الايضية للسموم معقدة جداً، خصوصاً اذا اعتبرنا ان الاشكال الكيميائية المختلفة لجزيئة السم الاساسية لها بالاضافة الى الأنشطة البيولوجية المختلفة خواص كيميائية مختلفة ولذلك ليس من الـضروري ان يكون لكل الجزيئات (جزيئات السم) نفس المصير. 5



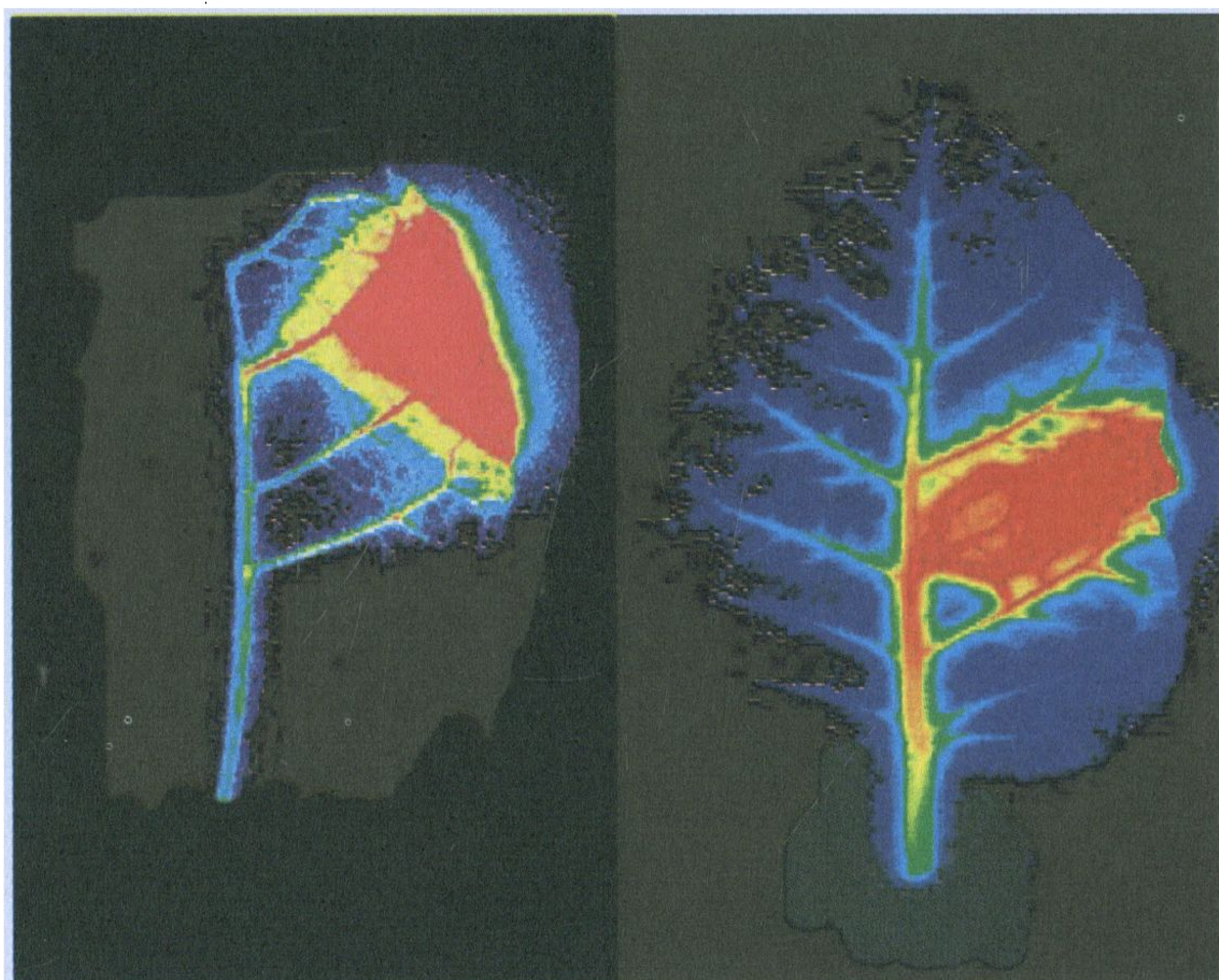
شكل (1) تأثير الحضن المسبق مع التابتوكسين على انزيم الجلوتامين سنثيتس Gluamine Synthetase في خلايا *pv. tabaci* (النوع البري) المكسرة بالأمواج الصوتية.

- نشاط الترانسفيرس (Transferase Activity) لأنزيم (النوع البري) Gluamine Synthease قيست في خليط خام لخلايا *Pv. tabaci* المكسرة بالأمواج الصوتية (Crude sonicated cells) والتي حضنت مسبقاً بدرجة 37م° ولفترات زمنية مختلفة مع 1ملغم/ مل ▲وبدون Δ تابتوكسين.
- اطروحة دكتوراه R. Taha, Ph.D thesis (1984) بموافقة.



شكل (2) إنزيم الجلوتامين سنثيتيس لبكتيريا *Pv. tabaci* (النوع البري)، حضن الانزيم مع التابتوكسنين_بيتا_لاكتام بوجود (■) وبعدم وجود (●) ADP (0.4mM). السيطرة الانزيم لوحدة حضن مع (□) وبدون (O) ADP بنفس التركيز حضنت المعاملات بدرجة 37م° أخذت عينات بفترات زمنية متساوية وقيست فعالية الجلوتامين سنثيتس (الترانسفيريس) Transferase Activity.

5



شكل (3) صورة توضح استخدام مادة حاوية على الكربون 11 المعلم في ورقة نبات التبغ



شكل (4) حقل لنباتات معرضة ومقاومة للإصابة بمرض افة لفحة الأوراق
http:/www.tari.gov.tw/tarie/photo/introduction

6

الفصل السادس
دور السموم في نشوء المرض
Role Of Toxins In Pathogenicity

1. المقدمة
Introduction

ان مصطلح المرضية (pathogenicity) يعني قابلية الطفيلي (parasite) لإحداث المرض. كما ان المصطلح مرض (disease) يعني تلف (damage) يُسبب بواسطة الميكروب (الكائن الممرض pathogen) وان السم في تعريفه يعتبر ذلك العامل المسبب لتلف واضح. بعبارة أخرى فان كل السموم تسبب جزأ من أو كل التلف الذي يشخص بواسطته المرض، وعليه فان السم يحدد الحالة المرضية (The state of pathogenicity).

تعتبر فرضية Gauman (1954) الأحياء الجهرية بكونها أحياء ممرضة (pathogenic) لأنها مولدة للسموم (toxigenic)، أما Turner (1984) فقد عرف السمية (قابلية توليد السموم toxigenicity) بأنها على الأقل محدد جزئي (partial determinant) للمرضية، إلا انه من الواضح، وكما سيعرض في هذا الفصل بان هناك بعض السموم لا تعتبر كعامل أساسي لاستعمار النسيج (colonization) من قبل الكائن الممرض. كما إنها ليست أساسية لتحديد قابليته الطفيلية (parasitic ability).

2. عملية الإصابة

The infection process

بعض الكائنات المرضة للنبات – المنتجة للسم (toxin-producing) ممكن أن تكون ممرضة عن بعد (telepathogenic). أي يمكنها إن تسبب المرض عن بعد بدون أن تكون بحالة اتصال طبيعي مع النبات. تجريبياً، فان نشوء المرض عن بعد (telepathogenesis)، يمكن إثباته بالسموم المنتجة خارج الجسم الحي in vitro (أي في الأوساط المختبرية).

مثال ذلك الفيكتورين (victorin) الذي يحفز الأعراض الطبيعية والمرئية الكاملة للمرض، كذلك التابتوكسين (tabtoxin) الذي يمثل العامل المحدد الوحيد للأعراض المميزة للمرض. على الرغم من ان المثالين السابقين خير دليل على ظاهرة نشوء المرض عن بعد، إلا أن أمثلة واضحة تحت الظروف الطبيعية، لكائنات ممرضة منتجة للسموم تعمل عن بعد من مضائفها قليلة جداً.

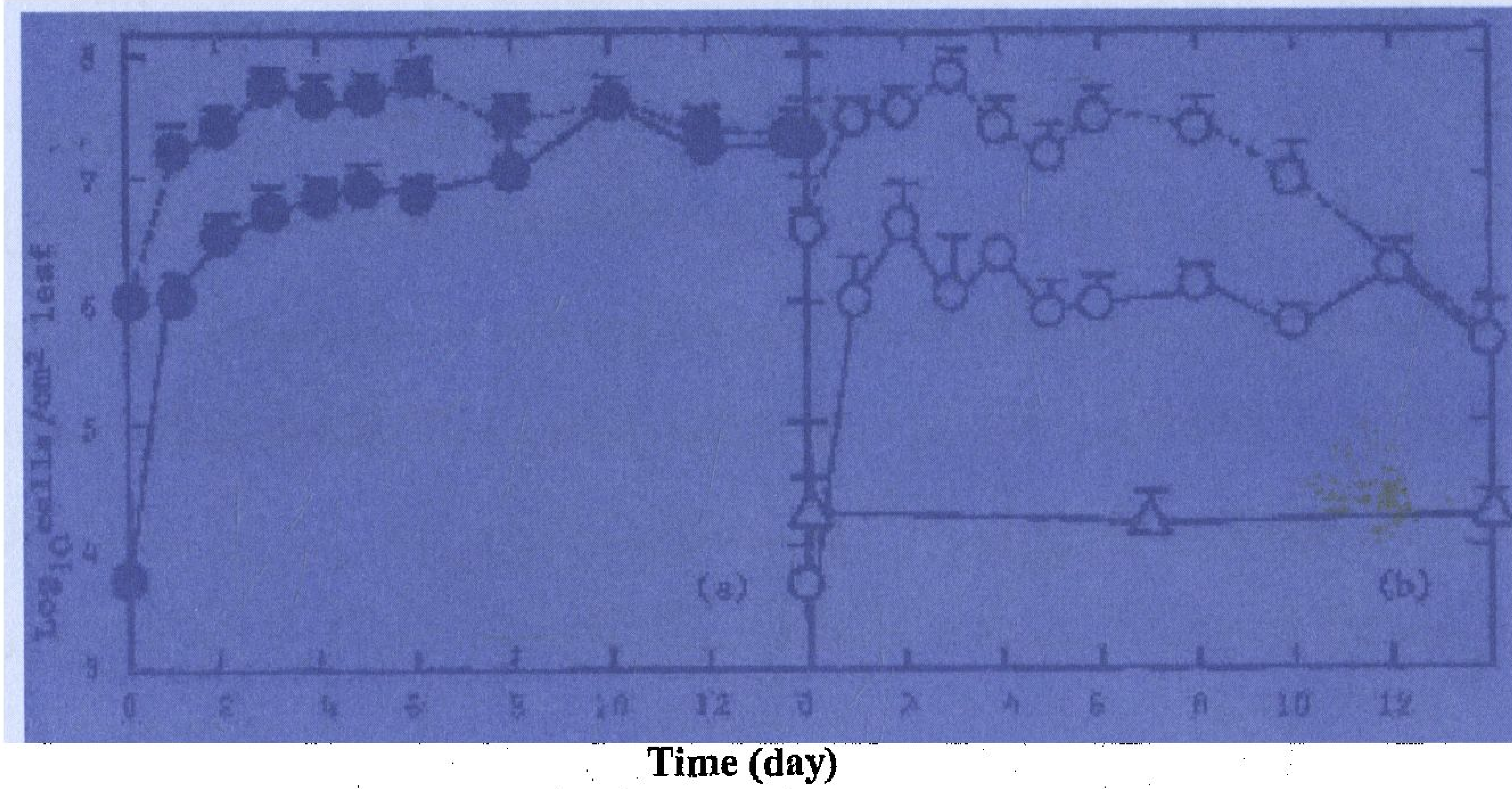
هناك شواهد تشير إلى ان بعض السموم المنتجة من قبل الأحياء المرضة تعمل على تهيئة النبات (predispostion) لان يُغزى لاحقاً من قبل الكائن المرض نفسه أو كائنات ممرضة أخرى. ان هذا الاستنتاج أتى من العمل مع السموم المنتجة بواسطة الفطريات، وليس هناك مثال لتوضيح هذه الحالة مع سموم البكتيريا. وقد فسر Ludwig (1960) ذلك بان الفطر ينمو على البذور أو مخلفات المحاصيل منتجاً السم الذي بدوره يهيأ النسيج النامي لان يُغزى بواسطة الفطر. كما وجد بان سبورات الفطر Helminthosporium sativum لوحدها لا تسبب مرض عند إضافتها للتربة، ولكن عند خلط السبورات مع السم غير النقي المنتج من فطر H. Sativum ينتج الأعراض النموذجية للمرض المؤدي إلى موت البذور. ولا يوجد شاهد أو دليل واضح لتفسير هذه الظاهرة فقد يكون السم الغير نقي محفز لنمو الفطر وبالتالي يحوله إلى كائن حي أكثر عدوانية.

هناك جانب آخر من عملية الإصابة هو ان بعض الأحياء المرضة المنتجة للسموم تستطيع ان تخترق النباتات المقاومة والمعرضة للإصابة بنفس السهولة مثل فطرا Helminthosporium maydis (Wheeler, 1977)، بينما قابلية أنواع أخرى من الأحياء المرضة المنتجة للسم لاختراق النسيج المقاوم اقل من النسيج المعرض للإصابة مثال ذلك فطر H. victoriae (Paddock, 1953). ولكن هل هناك شاهد أو دليل على ان السم يلعب دوراً مهماً في تحديد قابلية الكائن الحي المرض لاختراق النبات، سواءً بالنسبة للفترة الزمنية اللازمة للاختراق أو لعملية الاختراق نفسها. 6

وفي الحقيقة هناك بعض العزلات لفطريات ممرضة كالـ H. carbonum و H. victoriae والتي فقدت قابليتها على توليد السم إلا إنها ظلت محتفظة بقدرتها على إصابة النبات المعرض للإصابة والنبات المقاوم (Yoder & Schaffer, 1969; Lomstock & Scheffer, 1973).

والسؤال هنا، هل إن الكائن الممرض المنتج للسم يفقد قابليته على إصابة النبات عندما يفقد قابليته على توليد السم أو أن السم يحدد قابلية الكائن الحي لإنتاج المرض (pathogenic ability) أم قابلية الكائن الحي الطفيلية (parasitic ability).

لقد أوضحت الدراسة التي أجراها كل من Taha و Turner (1984) عن التابتوكسين (المنتج من قبل بكتيريا pv. tabaci) بان هذا السم يحدد قابلية البكتيريا على توليد المرض وليس له دور في تحديد قابليتها الطفيلية، حيث ان عزلات البكتيريا الغير مولدة للسم (أي غير المولدة للمرض في النبات المضيف) لها القابلية على استعمار (Colonized) نسيج النبات المضيف حيث استطاعت العزلات الغير مولدة للسم بان تنمو وتغزو أنسجة النبات المضيف بكفاءة مساوية إلى كفاءة العزلات المولدة للسم أي عزلات النوع البري (شكل 6-1 و الشكل 6-2).

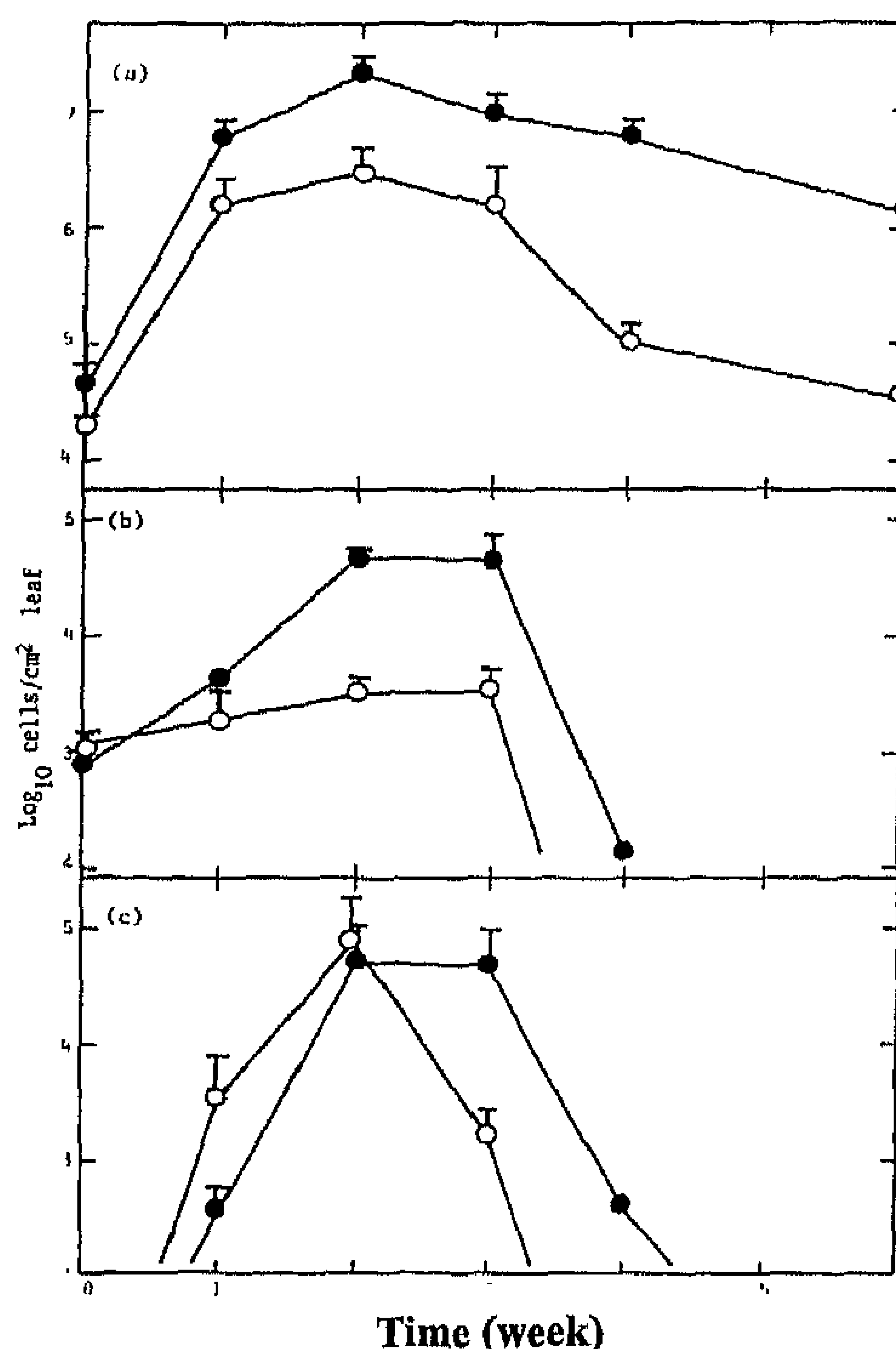

Time (day)

في أوراق التبغ

قطرات (5 مايكرو لتر) حاوية على خلايا بكتيرية مغسولة وضعت على جرح وخز الدبوس في أوراق نبات التبغ، وتم تعداد الخلايا الحية Vialbe cells للنوع البري pv. tabaci (●) طفرة غير مولدة للسم -Pv. tabaci tox (o) و Pv. putida (Δ) على أقراص من النسيج الملقح حفظ النبات في البيت الزجاجي بدرجة رطوبة حوالي 100 ٪.

يوضح منحنى النمو جرعتين مختلفتين من النوع البري Pv. tabaci والطفرة الغير مولدة للسم. وكل نقطة على المنحنى تمثل المعدل لأربع نماذج وكل نموذج يشمل 5 أقراص (بقطر0.7سم).

الخطوط المستقيمة تمثل الحيود عن المعدل (Standard deviation) للقيم الغير محولة إلى Log10.



شكل 6-2 : نمو وانتشار بكتيريا P. syringae pv. tabaci النوع البري والطفرة الغير مولدة للسم -Tox من نقطة التلقيح على ورقة نبات التبغ.

قطرات (5 مايكرو لتر) تحتوي على $4x10^4$ خلايا مغسولة من بكتيريا Pv. tabaci النوع البري (●) أو الطفرة الغير مولدة للسموم -Tox (o) وضعت على جرح وخز الدبوس في ورقة نبات التبغ، حفظ النبات في البيت الزجاجي بدرجة رطوبة حوالي 100٪.

العدد البكتيري الحي قد اجري على (أ) أقراص بقطر 0.7 سم تحتوي على نقطة التلقيح. (ب) حلقة مركزية تحيط القرص أ بقطر 1.2 سم (ج) حلقة مركزية اكبر تحيط الحلقة ب بقطر 1.8سم. كل نقطة تمثل أربعة نماذج وكل نموذج يحتوي على أقراص أو حلقات. الخطوط العمودية تمثل الحيود عن المعدل للقيم الغير محولة إلى Log10.

من هذا يمكن القول عندما تفقد البكتيريا قابليتها على توليد السم لا تفقد قابليتها على إصابة النبات المضيف، وكذلك فان السم يحدد قابلية البكتيريا على إنتاج المرض وليس قابليتها الطفيلية بغزو الأنسجة النباتية كما يحدث مع التابتوكسين.

وضح Patil وجماعته (1974) بان عزلات بكتيريا pv. phaseolicola الغير مولدة للفيزيولوتوكسين تنمو في نسيج النبات المضيف أيضاً، وبذلك فهي تحتفظ بقابليتها الطفيلية إلاّ أنها تفقد قابليتها على إنتاج المرض (الاصفرار Chlorosis).

ولابد من الإشارة هنا إلى عدم صلاحية استخدام المصطلحين عامل محدد أولي (Primary determinant) وعامل محدد ثانوي (Secondary determinant) للسموم (راجع التعريف الفصل الثاني)، لوجود سموم تعتبر عوامل محددة لإنتاج المرض إلاّ أنها غير أساسية أو مهمة لتحديد قابلية الكائن الحي على إصابة وغزو النبات المضيف.

3. الأعراض المرضية

Symptomatology

سبق وذكرنا بان الأعراض المرضية الناتجة عن السموم المرضة للنبات تكون محدودة بالاصفرار، الذبول والموت الموضعي للنسيج. إن إثبات دور السموم في التعبير عن العارض المرضي يأتي من السموم التي تعتبر العامل الوحيد في نشوء المرض ومن الأخرى التي لها دور متميز في إظهار المرض. ومع هذا تبقى هناك بعض الاستفسارات فيما إذا كانت الأعراض المرضية، ناتجة من التأثير المباشر للسم ام من نواتج تفاعل السم مع المضيف أم من الاثنين معاً.

وسنذكر هنا بعض السموم التي لها أدوارا وحيدة أو متميزة في التعبير عن العارض المرضي.

أ- الاصفرار Chlorosis.

يعتبر هذا العارض عارض مرضياً مألوفاً جداً، ويحفز من قبل العديد من السموم الناتجة عن الفطريات والبكتيريا، وكذلك من السموم الخاصة في إصابتها للمضيف والسموم الغير خاصة. ولعل خير مثال على ذلك في أمراض النبات 6 الناتجة عن سموم البكتيريا هو التابتوكسن (Tabtoxin) حيث يسبب منطقة اصفرار واضحة جداً ومتميزة على ورقة نبات التبغ مماثلة تماماً لما تسببه بكتيريا pv. tabaci التي تصيب نبات التبغ (Braun, 1955). ويعتبر التابتوكسين العامل المسبب الوحيد لعرض الاصفرار الناتج عن إصابة النبات ببكتيريا pv. tabaci وهذا الاستنتاج متأتٍ من أن عزلات البكتيريا pv. tabaci الغير منتجة للتوكسين ليس لها القابلية على توليد عارض الاصفرار عند إصابتها للنبات (Turner & Taha, 1984).

الفيزيولوتوكسين (Phaseolotoxin) يسبب عارض الاصفرار هو العامل الوحيد للتعبير عنهُ في النبات حيث اثبت Patil وجماعته (1974) بان العزلات البكتيرية Pv. phaseolicola الغير مولدة للسم لا تسبب اصفراراً لنبات الفاصوليا رغم إصابتها ونموها في النسيج النباتي.

ب- الذبول Wilting

يهتم الباحثون كثيراً بدراسة هذا العارض ولا تزال هناك آراء متناقضة عن دور السموم في التعبير عنهُ خاصة بالنسبة للسموم ذات الأوزان الجزيئية العالية. مثل ذلك السكريات المتعددة (Polysaccharides) والجليكوبروتين (Glycoprotein) فمثلاً هناك ادعاء Ries وStrobel (1972) الذي يقول ان الجليكوبروتين (Glycoprotein) المنتج من قبل بكتيريا Corynebacterium michiganense pv. insidiosum يسبب الذبول نتيجة لتأثيره السمي على سلامة

أغشية النبات في حين يدحض VanAlfer و Turner (1975) و Dey و VanAlfen (1979) هذا الادعاء بشواهد من ان سبب الذبول هو التداخل الميكانيكي للجليكوبروتين مع حركة الماء داخل الأوعية الناقلة دون التأثير على سلامة الأغشية. كذلك نوقش دور الاميلوفورين (Amylovorin) في عارض الذبول لمرض لفحة النار (Fire blight) من قبل Goodman وجماعته (1974) ودرس مرة أخرى من قبل Sjulin و Beer (1978).

جـ- الموت الموضعي للنسيج Necrosis

يعتبر هذا العارض اقل عارض مميز، وذلك لان موت الخلايا، الأنسجة والأعضاء يمثل الناتج النهائي لكل مرض يصيب النبات. وعلى الرغم من أن كل السموم المنتجة من قبل الإحياء المجهرية تسبب الموت الموضعي في تراكيز معينة، إلاّ أنها لا تقتل خلايا النبات بالتراكيز المتوقع تواجدها بها في الطبيعة. وليس هناك مثال على سم من أصل بكتيري يسبب الموت الموضعي لخلايا أو أنسجة النبات بتراكيز قليلة يمكن إعطاءه أو ذكره هنا، إلاّ ان السم المنتج من قبل الفطر Alternaria. Spp يعتبر خير مثال على ذلك، حيث انه يسبب موت النسيج وتنخره بسرعة وبتراكيز قليلة جداً (Gilchrist & Grogan, 1976; Nishimura et al., 1979).

4. تفاعلات المرض

Disease reactions

6

أ- تفاعل فرط الحساسية Hypersensitivity reaction

يعرف تفاعل الحساسية بأنه الاستجابة الخلوية القصوى للإصابة والتي ممكن أن تؤدي إلى درجة عالية من المقاومة للمرض. يسبب تفاعل فرط الحساسية الموت الفجائي لعدد محدود من خلايا النبات المضيف، المحيط بموقع الإصابة ويعتقد بأن موت هذا العدد المحدود من خلايا النبات ستحد من نمو وتطور الكائن الممرض في النبات (Wheeler, 1981).

وهناك فرضية مفادها بان المواد السمية المفروزة من قبل الأحياء المجهرية تعمل على تنشيط تفاعل استجابة فرط الحساسية في النبات (Litzenberger, 1949). وهناك شواهد تشير إلى أن المواد السمية ممكن أن تحفز تفاعل فرط الحساسية في نبات الشعير المعرض للإصابة بفطر البياض ألدقيقي (Powdery mildew) حيث أوضحوا بان المادة الغير نقية المستخلصة من النبات المصاب بهذا الفطر عند إضافتها إلى أوراق نبات الشعير المعرضة للإصابة، قبل تلقيح هذه الأوراق بالفطر نفسه، تعمل هذه المادة على تحطيم خلايا النبات ومنع نمو الفطر. إلاّ أنهم لم يوضحوا فيما إذا كانت هذه المادة المستخلصة من النبات المصاب هي من أصل نباتي أم من أصل مجهري.

دخول أجناس البكتيريا المرضية للنبات كالـ Pseudomonas، Xanthomonas وبعض أنواع الـ Erwinas المسببة لمرض تبقع الأوراق، إلى نسيج أوراق النبات المتنافر مع الجرثومة يؤدي إلى نشوء سريع لموت موضعي في النسيج، أي أن البكتيريا تحفز تفاعل فرط الحساسية.

عند دراسة تفاعل فرط الحساسية المسبب عن بكتيريا Pesudomonas syringae pv. tabaci، في نبات القطن (Gossypium hirsutum) الغير المضيف للبكتيريا وفي نسيج الأوراق الجنينية، لوحظ بان التغير الأولي الذي يحدث نتيجة لهذا التفاعل هو ليس في فعالية ضخ البروتينات من خلال الغشاء (Proton-extrusior pump) بل في وظائف الأماكن التي يحدث خلالها الانتشار السلبي للأيونات (Passive ion diffusion). مثل ذلك خلال النسيج الدهني أو القنوات البروتينية (Diffusion potential الانتشار الكامن). أن هذا الخلل في عملية الانتشار يؤدي إلى فقدان الالكتروليت (Electrolyte) وبالتالي موت الخلايا الموضعي.

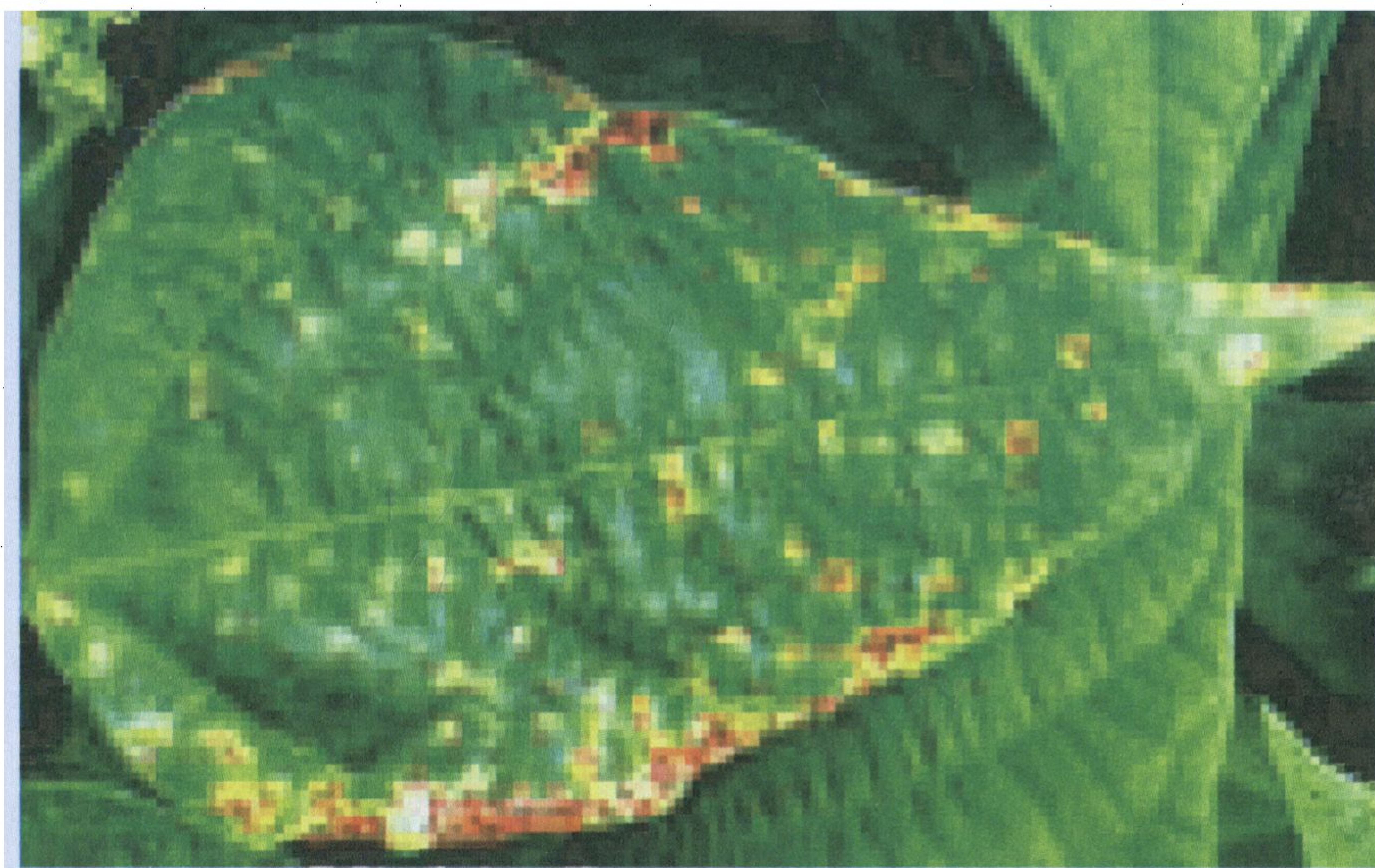
يفسر تفاعل فرط الحساسية مقاومة النباتات (غير المعرضة للإصابة أو المقاومة) للإصابة بالبكتيريا المرضة. (Wheeler, 1981).

ب- المرضية الكيميائية Chemopathogenicity

إن الفكرة التي تقول، بان الأحياء المجهرية المنتجة للسموم هي أساساً رمية التغذية (Saprophyte) وان الأحياء لا تستطيع غزو النسيج النباتي ما لم تحطمه أو تقتله بواسطة السم المفرز من قبلها، قد نوقشت من قبل Scheffer و Yoder (1972).

وقد أجريت دراسات كثيرة مع سموم الفطريات لإثبات هذه الفكرة مع النباتات المعرضة والمقاومة للإصابة (Wheeler, 1977).

وبصورة عامة ليست هناك شواهد مقبولة تشير إلى إن السموم تعمل كممرضات كيميائية (Chemopathogens) لقتل الخلايا قبل غزو واستعمار الخلايا النباتية من قبل الكائن الممرض نفسه المنتج للسم، إضافة إلى ذلك فهناك شك أخر من أن عدم وجود دليل مباشر وغير مباشر يشير إلى وجود تحضير أو حث حدوث أعراض المرض في المنطقة الغير محتلة من قبل الكائن الممرض.



شكل (1) التبقع البنى لأوراق نبات الفاصوليا والموت السريع للحد من نمو الكائن الممرض
Pseudomonas syringae Epmb.berkeley.edu



شكل (2) مرض تبقع أوراق الخس البكتيرى المسبب عن Xanthomonas campestris
www.apsnet.org.



شكل (3) موت النسيج النباتى وتنخرة بتراكيز قليلة من سم Alternaria
http:/hgic.clemson.edu/factssheet/graphic/2206/alt.

الفصل السابع

7

الاختبار الإحيائي لنشاط السموم

Toxins Bioassay

1. المقدمة

Introduction

في المراحل الأولى من أي دراسة تهتم بدور السموم المنتجة من قبل الإحياء المجهرية في المرض تعتمد على استخدام الاختبار الإحيائي (Bioassay). الاختبارات الإحيائية مطلوبة للكشف عن السموم ولذلك يجب أن تدرس ضمن المفاهيم التالية: الدقة والخصوصية، القدرة على تعين مقداره كمياً، الحساسية، البساطة وان يعطي الاختبار نفس النتيجة عند إعادته.

يُعرف السم أصلا بواسطة الاختبار الإحيائي ولحين إثبات تركيبه الكيميائي يبقى التعريف البيولوجي هو التعريف الوحيد له، لذلك يجب الاحتفاظ به. وهناك حالات عن الاحتفاظ أو الانتهاك للتعريف الأصلي للسم، سنوضحها بالمثالين التاليين.

السم المنتج من قبل Pseudomonas syringae pv. phaseolicola الفيزيولوتوكسين قد عرف على انه تلك المادة التي لها فعالية في الاختبار الإحيائي القياسي على الورق بما يلي (1) تسبب بقع صفراء متميزة، (2) تجمع الاورنثين، (3) يمكن عكس تأثيره بواسطة السترولين أو الارجنين (Patil et al., 1972). عندما اوجد Staskawicz و Panopoulos (1979) طريقة جديدة

للكشف عن السم تعتمد على منع أو تثبيط نمو بكتيريا Escherichia coli كان في منتهى الدقة لاختبار التقييم أو الاختبار الذي يحفظ فعلاً التعريف الأصلي للسم وحيث أن كل تحضيرات السم التي تثبط نمو E. Coli تسبب الاصفرار المميز في فحص اختبار الورقة، وان تثبيط نمو الـ E. Coli يمكن عكسه بواسطة السترولين أو الارجنين وليس الاورثنين. كل تحضيرات السم التي لا تثبط نمو E. Coli كذلك تكون غير فعالة في فحص اختبار الورق أيضا. وعليه نجد أن تعريف الفيزيولوتوكسين الأولي يحفظ التعريف الجديد لهُ.

السم الآخر هو T-toxin الذي يكونه فطراً لـ Helminthosporium maydis raceT (يعتبر هذا السم خير مثال على سم من أصل مجهري يوضح الحالة التي لا يحفظ فيها التقييم الجديد الاختبار الإحيائي القديم له). حيث يعرف السم على انه المادة التي لها نشاط شديدة نحو نبات الذرة ذو تكساس سايتوبلازم الذكر العقيم T وله نشاط قليل أو معدوم نحو الذرة ذو السايتوبلازم غير العقيم N . هذه الخاصية ملاحظة مع 37 نوعاً مختلفاً من الاختبار الإحيائي (Gregory etal., 1977). التقييم الجديد له، يعتمد على ارتباط السم المعلم بالكاربون 14 (C^{14} –labelled toxin) شبه النقي مع المستخلص الغير النقي لورقة حيث ينتج عن ذلك ارتباطه مع أوراق T وأوراق N بالتساوي (Ireland & Strobel, 1977).عليه ، واعتماداً على التعريف، فان التقييم الجديد لا يعتبر فحصاً للسم T . لذلك فالتقييم الجديد يعبر عن حالة انتهاك للاختبار الإحيائي للسم.

عدد الاختبارات الإحيائية المستخدمة لتقييم السم هي اختبارات الجذر والنمو، اختبارات الأوراق والسيقان، نضح الالكتروليت وأنواع أخرى . النباتات المقاومة للسموم والسموم التالفة (أو الخاملة Inactivated toxin) لأغراض السيطرة.

2. الغرض من البحث

Purpose of investigation

7 أن اختيار الاختبار الإحيائي للسم يعتمد على الغرض الذي من اجله يراد تقييم السم. فإذا كانت الغاية هو لضبط نقاوة السم فان التقييم يتطلب حساسية عالية للسم في حين لا يكون ذلك ضرورياً في حالة التفتيش عن نباتات مقاومة فقط للسم.

أ- تعيين سموم جديدة

في حالة الكشف عن سموم جديدة لابد من وجود تقييم كفوء وسريع لذلك. وعادة يستخدم، كما موضح في التقارير، اختبار الأوراق وذلك بوخز الورقة وعمل جرح صغير يوضع عليه المحلول المراد فحصه أو عمل قطِع في السيقان يتم من خلاله امتصاص المحلول.

إلا إن بعض السموم لا يمكن تعيينها بواسطة هذين الاختبارين الإحصائيين حيث تحتاج إلى أكثر حساسية، وعليه يمكن أن تكون النتيجة سالبة كاذبة في حين أن المحلول الذي تحت الدراسة لا يخلو من تأثير سُمي للنبات.

ب- السيطرة على عملية تنقية السموم

للحصول على بروتوكول تنقية لسم معين، فان ذلك يتطلب اختباراً إحيائيا يكون على مستوى عالٍ من الحساسية والقدرة على التقييم الكمي. أن منحنى الاستجابة للجرعة (جرعات السم) يجب أن يكون خطاً مستقيماً مع متغيرية قليلة جداً، لمدى واسع من تراكيز السم. أن مثل هذا الاختبار الإحيائي يمكن بواسطته تقدير كمية السم في أي خطوة من خطوات التنقية، وبالتالي يمكن

معرفة مقدار الفقدان في كميته خلال مراحل تنقيته. حساب الفعالية النوعية(Specific activity)يشير فيما إذا تمت عملية التنقية أو لا.

جـ- تعيين ميكانيكية التفاعل

يمكن ان يحدد محل الفعل الجزئي للسم من نتائج الاختبار الإحيائي لبعض السموم تظهر نتيجة التحليل، خارج الجسم الحي in vitro تفاعلاً بين السم النقي وإنزيم نقي : مثلاً يثبط السم الفيزيولوتوكسين إنزيم الاورنثين كارباميل ترانسفيريس ويثبط انزيم الجلوتامين سنثيتيس بواسطة التابتوكسنين-بيتا-لاكتام . وعلى هذا الأساس معرفة مكان السم داخل جسم النبات in vivo وبالتالي معرفة ميكانيكية فعله داخل جسم النبات الحي in vivo. إن معرفة محل الفعل الجزيئي للسم يساعده على تطوير إجراء الاختبار الإحيائي.

د- الكشف عن المقاومة للإصابة بالأمراض

السموم المسببة للأمراض يمكن الاعتماد عليها في انتخاب سلالات مقاومة من النباتات للأمراض. حيث ان استخدام السموم يكون أفضل من حيث الوقت، المكان والجهد العملي من النبات أو بذوره حيث أن الأخير يحتاج إلى مساحات زراعية واسعة إضافة إلى خطورة إجراء التجارب في الحقل لانتشار الإصابة إلى حقول أخرى.

7

3. مكونات الاختبارات الإحيائية

Components of bioassays

السم Toxin

أ- النقاوة Purity

السموم المنقاة لدرجة كبيرة لحد التجانس العالي، والمشخصة كيميائياً، والمقيمة من ناحية الثبات والاستقرار يمكن أن تخضع إلى الاختبار الكيميائي أو الفيزيائي (Shaw, 1981). الاختبارات الإحيائية مطلوبة مع السموم الغير نقية (الخام Crude) أو الشبه نقية (Partially purified). مع السموم النقية جداً الاختبار أو التقييم يمكن ان يشمل التحليل الكروماتوجرافي(Chromatography) أو قياس الأطياف الضوئية (Spectral measurement) للألوان (Colorimetric) واستخدام السموم المعلمة المشعة (Radiolabeling). في كل هذه التقييمات يجب التأكد من ان الاختبار يعين السم النشط بيولوجياً ولا يتداخل مع المركبات الغير معروفة التركيب الملوثة للسم أو مع المركبات الناتجة من تكسير السم نفسه.

- استخدام المواد المشعة. عند تحضير سم معلم بمواد مشعة (Radiolabeling) فان الجزء المشع يجب ان يتواجد في جزيئة السم النشطة بيولوجياً فقط. ولعل اضمن طريقة للحصول على سم معلم بمواد مشعة هو البناء الكيميائي له (التحضير الكيميائي Chemical preparation). وقد جربت هذه الطريقة مع سموم الفطريات، على سبيل المثال، التنتوكسين (Tentoxin). فقد اثبتَ تركيبه بواسطة بنائه كيميائياً ، حيث تضمنت الطريقة استخدام

الحامض الاميني الالنين المشع (^{3}H.alanine) احد مكونات السم كمـادة أوليـة في التفاعل.

احـد الـسموم البكتيريـة، الفيزيولوتوكـسين، لم يـصنع كيميائيـاً (أو يبنـى كيميائياً) لحد الآن، إلا انه نقيٌّ لدرجة كبيرة وحدد تركيبـه بـصورة قاطعـة، ممـا سهل عملية تحضيره كسم معلم بمادة مشعة باستخدام المزرعة البكتيرية.

والدليل على أن المادة المشعة هي في الحقيقة جزء من المادة النشطة بيولوجياً اعتمد أساسا على التطابق الذي يحصل عليه لنشاط المادة المشعة من نشاط السم في النظام الثنائي الأبعاد، تحليل الهجرة الكهربائية الرقيقة الطبقة/ تحليـل الطبقـة الكرومـاتوغرافي الرقيقـة (-2- dimensional thin layer electrophoresis/thin layer chromatography).

ومن الراشح الـذي يُحـصل عليـه مـن عمـود التحليـل الكيميـائي -QAE Sephadex (QAE-sephadex column chromatography). إضـافة إلى هـذا فـان رواشح المزارع البكتيرية، للعزلات الغير منتجة للسم لا تحتوي على مادة مـشعة نشطة في منطقة الشكل المظهري (Profile) والتي عادة تشغل بالفيزيولوتوكـسين. إلا انه لا يزال هناك قليل من الشك حول هذا السم مـن حيـث الاعتمـاد علـى استخدام المواد المشعة لاختباره، لكونه غير ثابت في حالته التامة النقاوة مما يسبب نواتج تكسير السم في تحضيراته (Mitchell, 1979).

– استخدام الكيمياء المناعية. (Immunochemistry). الـسموم المحفـزة علـى تكوين الأجسام المضادة لها (Antigenic toxins) والتي نقيت لحد التجـانس التـام يمكـن الكـشف عنهـا باسـتخدام الأضـداد (الأجـسام المـضاد) المـشعة لهـا (Fluorescent antibody). فقـد تمكـن Paynter و Alconero (1979) مـن تنقيـة

السيرينجيومايسين (عبارة عن متعدد الببتيدات صغير) لحد ظهوره بشكل مركب متجانس على طبقة التحليل الرقيقة TLC وفي جل الهجرة الكهربائية (Gel-electrophoresis). حضرت الأضداد (الأجسام المضادة) لهذا السم واقترنت بمادة الايزوثايوسيانيت المشعة (Fluorescent isothiocyanate). تترسب الأضداد (الأجسام المضادة) المشعة هذه عند تفاعلها مع السيرينجيومايسين. وان أنسجة النبات المعاملة بالسيرينجيومايسين تصبح مشعة عند معاملتها، مع الأجسام المشعة المحضرة ضد السم. في حين أنسجة نباتات السيطرة (الغير المعاملة بالسم) لا تظهر مثل هذا الإشعاع، عند معاملتها بالأضداد (الأجسام المضادة) المشعة ان هذا النوع من الاختبارات الإحيائية يحتاج إلى المزيد من الدراسات من اجل التوصل إلى تقييم معتمد. ولابد من تحضير الأضداد (أجسام مضادة) مشعة ضد السم الغير نشطة بيولوجياً (Inactive toxin) كفحص سيطرة وكذلك تحضير الأضداد (أجسام مضادة) مشعة ضد كل المواد الملوثة (Impurities) المحتمل تواجدها مع السم الفعال كزيادة في الحيطة والحذر وكفحص سيطرة أخر.

- تعقيدات النقاوة. ان مستوى النقاوة لأي مركب في نظام التقييم (Assay system) يمكن ان يؤثر على تعريف السم نفسه. ولعل خير مثال على ذلك التعقيدات والحيرة التي ظهرت خلال تعريف التابتوكسين وتحديد موقع فعله وبالتالي ميكانيكية عمله وتفسير أعراض المرض. التابتوكسين النقي يسبب الاصفرار وتثبيط انزيم الجلوتامين سنثتيس في نبات التبغ in vivo إلا انه لا يسبب

تثبيط انزيم الجلوتامين سنثتيس النقي خارج الجسم الحي in vitro (R.Taha-Ph.D thesis 1984) هذا التناقض في عمل السم قد وضح فيما بعد بما يلي:

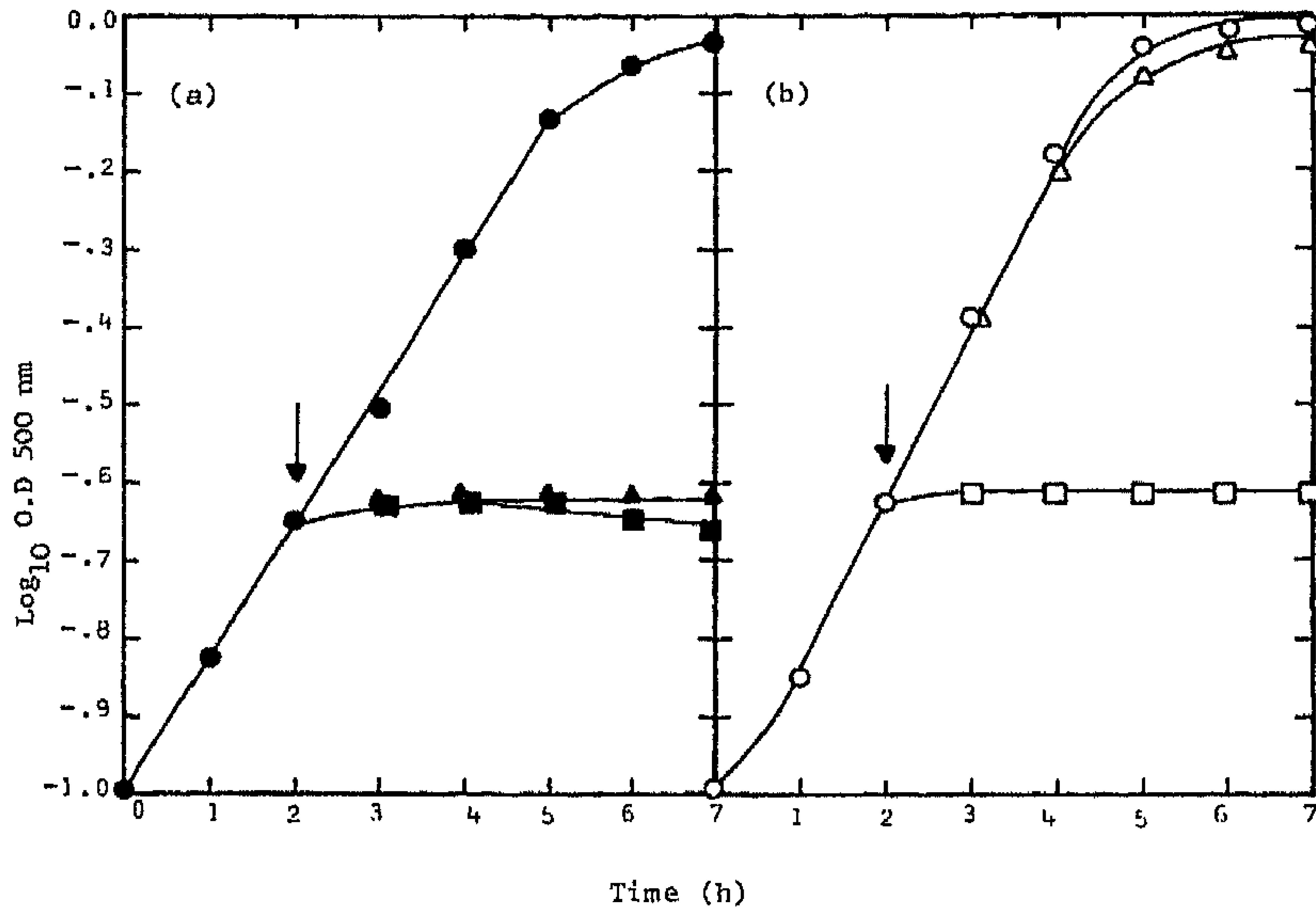
أولاً: أن الجزء الفعال للسم هو تابتوكسنين-بيتا-لاكتام Tabtoxinine- β- Lactam ، ناتج تحلل التابتوكسين.

ثانياً: يتم تحويل التابتوكسين من شكله الغير النشط إلى شكله النشط بيولوجياً بواسطة الإنزيمات المحللة للببتيدات (Peptidase) (Uchytil&Durbin,1980;Turner&Taha,1984). ويفسر هذا نشاطه داخل جسم النبات حيث يتم تحليله بواسطة إنزيمات النبات المحللة للببتيدات.

ثالثاً: كما اثبتَ (R.Taha-ph. Dthesis 1984) بان التابتوكسين يكون فعالاً في الأجسام الحية الحاوية على الإنزيمات المحللة للببتيدات فقط ولا يتوقع له فعالية في الأجسام الحية الخالية منها. حيث يثبط التابتوكسين نمو بكتيريا Salmonella typhimurium النوع البري (Wild type LT_2). ولا يثبط نمو الطفرة الفاقدة للإنزيمات المحللة للببتيدات (Peptidase deficient mutant salm. typhimurium NT1246) شكل 7-1 بينما يثبط التابتوكسنين-بيتا-لاكتام نمو الاثنين.

رابعاً: على أساس ما تقدم، فان تحليل التابتوكسين ضروري جداً لإظهار نشاطه البيولوجي، وان حقنه في الجسم الحي in vivo يجب ان يرافقه مرحلة تباطؤ أو فتور(Lag phase) لحين تحليله إلى شكله النشط وبالتالي تثبيط الجلوتامين سنثتيس. في حين يتوقع بان تثبيط هذا الإنزيم داخل جسم النبات يكون حالاً (شكل 7-2) عند حقن التابتوكسنين-بيتا-لاكتام (Turner&Taha,1984).

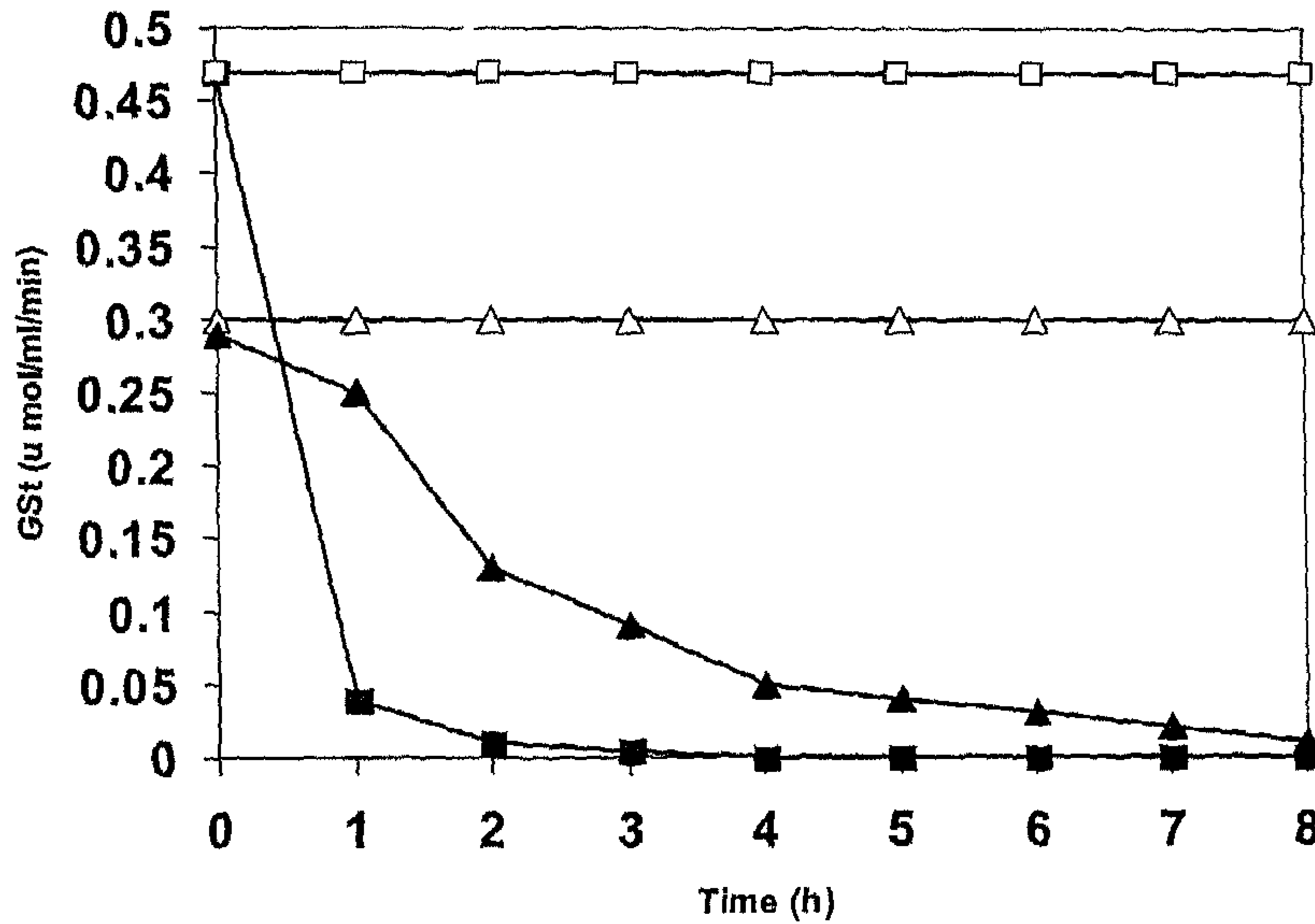
7



شكل 7-1 : نمو بكتيريا Salmonella typhimurium LT_2 النوع البري والطفرة الفاقدة للإنزيمات المحللة للببتيدات Peptidase deficient mutant NT1246 بوجود التابتوكسين والتابتوكسنين-بيتا-لاكتام

وسط M_9 السائل لقح بمزرعة Salmonella typhimurium النوع البري (الرمز المغلق) أو بمزرعة الطفرة NT1246 (الرمز المفتوح) وحضن بدرجة 37م° بحاضنة هزاز. التابتوكسي(▲،△) أو التابتوكسنين-بيتا-لاكتام (■،□) و (0.1 ملغم/ مل) أضيفت (السهم) إلى النوع البري والنوع الفاقد للإنزيمات المحللة للببتيدات تسحب النماذج بفترات زمنية متساوية وتقرأ الكثافة الضوئية (Optical density). نماذج السيطرة (بدون إضافة التابتوكسين أو التابتوكسنين-بيتا-لاكتام) للنوع البري (●) والطفرة (o) تقرأ في نفس الفترات الزمنية.

أطروحة دكتوراه : رحاب رشيد طه (1984) بموافقة .



شكل 7-2 : الزمن اللازم لتثبيط انزيم الجلوتامين سنثيتس (من نبات التبغ) بواسطة التابتوكسين والتابتوكسنين-بيتا-لاكتام

أقراص من ورقة واحدة لنبات التبغ (عددها 40 ، قطر القرص 1.5سم) تُرشح تحت فراغ (Vacuum infiltrate) بمحلول التابتوكسين أو التابتوكسنين-بيتا-لاكتام المتساويين في التركيز تقاس نشاط إنزيم الجلوتامين سنثيتس في الأقراص المترشحة بالتابتوكسين (▲) أو التابتوكسنين-بيتا-لاكتام (■). تؤخذ 5 أقراص كل ساعة، تمزج جيداً لحد التجانس مع 1 مل من محلول منظم (Tris-HCl buffer) 50 مل.مول ودرجة حموضة 7.0 يحتوى على مركبتوايثانول 15 مل.مول. يرسب الخليط المتجانس بجهاز الطرد المركزي (15000 دورة في الدقيقة، 10 دقائق، 4م°) وتقاس نشاط الإنزيم في الراشح. نماذج السيطرة أقراص ترشيح تحت فراغ بالماء المقطر. تؤخذ نماذج السيطرة من نفس الورقة المستخدمة لفحص التابتوكسين (△) أو التابتوكسنين-بيتا-لاكتام (□).

ب- الوزن الجزيئي Molecular weight

يعتبر تعين الوزن الجزيئي للسم المكتشف حديثاً من أهم الأمور. ويرتبط هذا بصورة وثيقة مع الاختبار الإحيائي، لان السموم ذات الوزان الجزيئية الصغيرة، بصورة عامة، تكون نشطة ضد خلايا النبات مباشرةً. في حين السموم ذات الوزان الجزيئية العالية، مثل السكريات المتعددة والجليكوبيتيدات (Glycopeptide) والتي يكون نشاطها ميكانيكياً على الأنسجة الناقلة. على سبيل المثال، الاميلوفورين المنتج من بكتريا Erwinia amylovora عبارة عن سكريات متعددة سامة (Toxic polysaccharide). يعمل هذا التوكسين على غلق سريان الماء خلال مقاطع الساق وبالتالي يقلل من كمية الماء المجهز لنسيج النتح مسبباً الأعراض المرضية، الذبول. يعزى النشاط البيولوجي للاميلوفورين إلى حقيقة كونه ذا وزن جزيئي عالٍ ($Mol.wt.\ 1.65x10^5$) مما يؤدي إلى غلق العروق وعدم وصول الماء إلى الورقة. الجليكوبيتيد ($Mol.wt.5x10^6$) المنتج من قبل Corynebacterium insidiosum المسبب لمرض الذبول في نبات البرسيم يقلل من سريان الماء خلال مقاطع الساق أيضا. ينتج الذبول في السيقان التي تتعرض لكمية قليلة جداً من السم حوالي 2 مايكور غرام وهناك دليل آخر على ان نشاطه هو منع سريان الماء خلال الساق، وليس تأثيره على نفاذية الأغشية، حيث ان استئصال جزء الساق المعرض له يؤدي إلى شفاء الساق من الذبول.

من هنا يمكن القول بأن الوزن الجزيئي للمادة المراد تقيمها قد يساعد في اختيار الاختبار الإحيائي الأمثل لتعين فعاليتها.

جـ- طريقة فعل السم Mode of action

ان معرفة طريقة فعل السم وتأثيره المباشر يسهل لدرجة كبيرة إيجاد الاختبار الإحيائي السريع والحساس في نفس الوقت. والمعروف ان سموم البكتيريا تكون

إمـا مثبطـات للإنزيمـات (Enzyme inhibitors) أو مـضادات لنـواتج التمثيـل الايضي (Antimetabolites) يمكن زيادة حساسية الاختيار اذا تم تعـريض موقـع الفعل الجزيئي إلى السم مباشرة. كما يمكن تحديد الاستجابة للتفاعل بـين الـسم وموقع الفعل الجزيئي بـصورة كميـة أيـضاً مـثلاً يثـبط الفيزيولوتوكـسين انـزيم الاورنثين كارباميل ترانسفيريس من المصادر الحية المختلفـة كالنبـات والبكتريـا. حسب طريقة Mitchell (1979) فـان اختبـار الاورنـثين كاربامـيـل ترانـسفيريس (ED50=0.3μM) وهو 100-1000 أكثر حساسية للفيزيولوتوكـسين مـن اختبـار الأوراق الإحيائي (والذي يكـشف عنـه بــ μM35-3.5 مـايكرومول). كمـا ان اختبـار الأوراق الإحيـائي وتكـوين الاصـفرار هـو لـيس فحـص خـاص بالفيزيولوتوكسين حيث هناك العديد من السموم المسببة للاصفرار والتي تعطـي نفس النتيجة.

د- الثبات Stability

ان المعدل الذي يتم فيـه تحليـل جزيئـات الـسم تحـت ظـروف التقيـيم (أو الاختبار الإحيائي) ممكـن أن يـؤثر علـى النتيجـة النهائيـة للتقيـيم. ان النـشاط البيولوجي للتابتوكسين تعتمد على تحليله إلى التابتوكسنين_بيتـا_لاكتـام، إلا أن تحويل الأخير إلى جاما لاكتام (δ-Lactam) يجعله غير نشط بيولوجياً (Taylor et al., 1972). كـذلك نـاتج تحلـل الفيزيولوتوكـسين، الفوسفوسـلفاميل اورنـثين (Phosphosulfamylornithine) هو الجزء النشط بيولوجياً. لـذلك ومـع التقيـيم الكمي للسموم الغير ثابتـة، يجـب اسـتخدام اختيـار أحيـائي سـريع جـداً مـثلاً استخدام اختبار تسرب الالكتروليت (Electrolyte leakage) يكون مرغوباً لهـذا الغرض (Damann et al., 1974).

هـ- الخصوصية Specificity

تشمل السموم ما يلي (1) سموم تصيب مضيف الكائن الحي المنتج لها (2) سموم تؤثر على عدد محدود من النباتات المضيفة وغير المضيفة للكائن الحي المنتج لها. (3) سموم تبدو خاصة في إصابتها للمضيف المتمثل بالنباتات الراقية 7
وتؤثر كذلك على الإحياء الجهرية. (4) سموم لها تأثير قاتل للأحياء كافة حيوانات، نباتات، أحياء مجهرية. (Sinden & et al., 1968; Bamburg & Strong, 1971; Devay et al., 1978 ; Vchytil & Durbin, 1980)

على الرغم من ان الخصوصية العالية تحدد اختيار نوع النبات لإجراء الاختبار الإحيائي أو التقييم إلا أن فوائدها مهمة جداً حيث تسمح بتشخيص السم حتى بشكله الخام نسبياً. على العكس من ذلك عندما يكون مستوى الخصوصية واطئ فان التقييم يحتاج إلى سم ذي نقاوة عالية. على أية حال فان اختيار نوع الاختبار ممكن ان ينتقى حسب الظروف الملائمة له.

فمثلاً السيرينجيومايسين له تأثير قاتل ضد الأحياء بصورة عامة، حتى ضد الكائن الحي المنتج له. إلا ان فطر الـ Geotrichum candidum واحداً من أكثر الإحياء حساسية لهذا السم لأجل تقييم نشاطه كمياً، تؤخذ قطرات بحجم 10 مايكرولتر من سلسلة من التخافيف وتوضع على سطح الاجار في الأطباق، تجفف وترش بعالق من سبورات G. candidum بعد 24 ساعة تعرف وحدة النشاط للسم بأنها تلك الكمية التي سببت منع أو تثبيط كامل لنمو الفطر (Sinden & et al., 1971).

هناك طحلب الـ Chlorella vulgaris المستخدم مع عدد مختلف من السموم في الاختبارات الإحيائية ((Braun, 1955; Ikawa et al., 1969)). فوائد هذا الطحلب تشمل حساسيته للعديد من السموم، نموه السريع في الأوساط الزراعية المختبرية، نموه في الأوساط الزراعية السائلة والصلبة مما يسهل عملية قياس النمو

سواءً بواسطة الكثافة الضوئية أو بواسطة مناطق تثبيط النمو على السطح الصلب (Zone of inhibition) وأخيرا تعرض الخلايا مباشرةً لفعل السموم وتجنب مشاكل الاختراق خلال الحواجز المختلفة للكائن الحي. كل هذه الفوائد ممكن ان تعوض عن كون هذا الكائن الحي غير خاص لسم معين.

ان اختيار الاختبار الإحيائي الغير ملائم لتشخيص السم ممكن ان يؤدي إلى إرباك في تحديد خصوصية مضيف معين للسم فقد اعتبر Goodman وجماعته (1974) بان الاميلومورين يصيب مضيفاً خاصاً (Host specific toxin) معتمداً على نشاطه، تكوين الذبول في اختبار القطع (Cutting assay). الدراسات اللاحقة أثبتت بأن الاميلوفورين يسبب الذبول لسبب ميكانيكي حيث يمنع أو يعرقل سريان الماء خلال الأوعية الناقلة وليس له تأثير على نشاط الخلايا. وعليه فهو لا يصيب مضيفاً خاصاً (Non host specific toxin)، (Beer et al., 1981).

النبـــات

ان خاصية السموم تحدد اختيار الكائن الحي المستخدم في الاختبار الإحيائي. في حالة كون السم ليس له تأثير على الإحياء المجهرية، واختيار النباتات الراقية للاختبار محدود لكون السم يصيب مضيفاً خاصاً (Host specific toxin)، فلا بد من إيجاد اختبار إحيائي يعتمد على طبيعة نبات حساس لذلك.

ان حساسية الإحياء المجهرية لبعض السموم سهلت عملية إيجاد اختبارات إحيائية دقيقة ومعتمدة وسريعة. وبصورة عامة معظم سموم البكتيريا لها تأثير على إحياء مجهرية أخرى مما سهل اختيار الاختبار الإحيائي المطلوب (Gasson, 1980).

هناك بعض الأمور الواجب ذكرها في هذا المجال فيما يخص النبات.

أ- التركيب Structure

هناك عدد من السموم التي تصيب مضيفاً خاصاً، تصيب الحبوب. وتمتاز هذه النباتات بان تكون لها حبوب كبيرة بحيث تنتج جذور نامية تحت الظروف المختبرية. للسموم المؤثرة على هذه النباتات يمكن استخدام الاختبار الإحيائي الخاص بنمو الجذور البادرات (Luke & wheeler, 1955). يمكن إجراء هذا الفحص بسهولة كما ويمكن إجراء تقييم شبه كمي إضافة إلا انه يعطي نفس النتيجة في كل مرة.

7

ب- سهولة إجراء الاختبار يدوياً

يعتبر فحص الاختبار الإحيائي الخاص بالأوراق من أسهل الاختبارات. وقسم من النباتات لها أوراق تجعلها ان تكون هي المفضلة في الاختبار فمثلاً الفيزيولوتوكسين يسبب اصفرار لعدد كبير من الأوراق لنباتات مختلفة، إلاّ أن Rudolph و Rasche (1979) فضل استخدام أوراق الشوندر لهذا الاختبار للأسباب التالية : النبات الواحد يمكن ان يجهز أوراق عديدة ولعدة سنين في البيت الزجاجي، سهولة حقن الأوراق بالسم وسرعة ظهور الأعراض.

استخدام الاختبار الإحيائي للأوراق مع عدد آخر من السموم كالتابتوكسين (Durbin & Sinden, 1967).

جـ- فسلجة النبات

ان فسلجة النبات المراد إجراء الاختبار الإحيائي عليه يمكن ان تؤثر على نتيجة الفحص، كيفية تصميمه أو نوع الاختبار الممكن إجراءه. فمثلاً لا يجوز استخدام النباتات الراقية C_4 لتقييم التابتوكسين حيث أن الأخير يؤثر على نباتات C_3 فقط (راجع Keys et al.,1978; Somerville & Ogren, 1980; Turner & Debbage,

1982). كذلك اثبت عدم ملائمة Chlorella Vulgaris لدراسة تأثير التابتوكسين على النبات (R. Taha PhD thesis 1984) وبدلاً عنها لابد من استخدام نبات الـ Asparagus ، أو Chlamydomonas (Cullimore & sims, 1980). ان عدم ملائمة *الـ* Chlorella vulgaris *ككائن* تجريبي لفعل التابتوكسين يعود إلى كون هذا الكائن يفتقد إلى بعض الإنزيمات اللازمة لدورة النتروجين التنفسية الضوئية (photorespiratory-N-cycle) ، (Hess & Tolbert, 1967) أي ان هذه الدورة مشكوك تواجدها في هذا الكائن. ومن جهة أخرى فقد اثبت بان تطور الأعراض وتراكم الامونيا في الأنسجة النباتية المعاملة بالتابتوكسين، مشتقة من دورة النتروجين التنفسية الضوئية (Turner & Debbage, 1982). في البحث عن كائن حي تجريبي ملائم لمعرفة سم معين مراعاة فسلجة الكائن الحي بحيث يؤثر السم فعلاً على هدف حساس يحتاجه ذلك الكائن التجريبي لإدامة نشاطه الحيوي.

4. المعالجة التجريبية

Experimental manipulation

أ- المتغيرية Variability

ان الاختبارات الإحيائية أصلا تكون متغيرة وذلك لان الأنظمة البيولوجية، أنظمة معقدة (Roberts & Boyce, 1972). إلا انه تبقى على الباحث مسؤولية تحديد الخطأ ومحاولة تقليله إلى الحد الذي يكون مقبول عند تحليله إحصائيا. إن عدم الكفاءة في تصميم التجربة لا يمكن تصحيحه بصورة جيدة بالمعاملات الإحصائية.

أولاً: النبات. هناك أمور تتعلق بظروف البيئة والفسلجة، والتي من الممكن ان تؤثر على النتيجة النهائية للتقييم أو الاختبار الإحيائي. مثلاً الأوراق المأخوذة من

نبات منمى تحت درجة حرارة عالية أقل حساسية للسم (Bronson & scheffer, 1977). وجد Onesirosan وجماعته (1975) بان نبات الطماطة المنمى تحت ظروف تغذية ناقصة أو ضعيفة يكون أكثر حساسية لسم Corynespora cassiicola ، من النبات المنمى في ظروف تغذية جيدة. عكس ذلك وجد Damann وجماعته 7 (1974) حيث لاحظ ان نبات الشوفان المحفوظ تحت ظروف تغذية جيدة يكون أكثر حساسية لسم Helminthosporium victoriae من النبات المنمى تحت ظروف ناقصة التغذية.

عمر النبات له أهمية كبيرة في تقييم الاختبار الإحيائي فمثلاً أوراق نبات الفاصوليا المعمر غير حساسة لسم Pseudomonas syringae pv.phaseolicola في حين أوراق النبات الصغير حساسة جداً للسم (El-Banoby & Rudolph, 1979). الاختبار الإحيائي المعتمد على البذور يتأثر جداً بنوعية البذور .(Templeton, 1972; Wheeler & Ammon, 1977)

ثانياً: الإجراءات العملية. إن فحص التجربة اللازمة للاختبار الإحيائي يُمكن الباحث من السيطرة على مصادر الاختلاف والتغير في النتائج. فمثلاً تحضير نسيج لتقيم معين يعتبر مصدراً كامناً للخطأ. فقد وجد بان حجم قطع الأوراق المستخدمة لاختبار تسرب الالكتروليت مهم جداً. فالقطع التي بطول 0.5 سم تسرب أسرع من قطع الورقة التي طولها 2.0 سم. النماذج الكبيرة من قطع الأوراق 2 غم تسرب حوالي مرتين أسرع من النماذج التي وزنها 0.1 غم. إعطاء السم للنبات عن طريق الترشيح تحت فراغ (Vacuum infiltration). يسبب تسرب الالكتروليت بشكل أسرع مما لو يوضع النبات في محلول السم فقط(Damann et al., 1974)، هناك مشاكل من اختراق السم لنسيج معين فمثلاً بعض السموم لا يمكن ان تعطي نتيجة موجبة في الفحص إلا إذا تم إدخالها عن طريق قطع أو خدش معين. في حين سموم أخرى لها قابلية اختراق ضعيفة

لسطح النبات السليم وممكن ان تعطي نتيجة موجبة كالفيزيولوتوكسين (Rudolph & Rasche, 1979). شخصت بعض العوامل الحرجة والضرورية لإجراء الاختبارات الإحيائية، فمثلاً، الضوء يعتبر عاملاً مهماً لتقييم نتيجة الاختبار. التابتوكسين يحتاج إلى الضوء لكي يسبب الاصفرار(Durbin & Sinden, 1967) . سم أخر غير محفز للاصفرار ينتج من قبل P. Syringae pv.syringae يسبب منطقة تلف اصغر بوجود الضوء مما في الظلام (Khan & Rudolph, 1978). ولا بد من الإشارة إلى صعوبة التقييم الذي يُقَيم مواد الطاقة كالـ ATP حيث تمتاز هذه المواد بعدم ثبوتها وسرعة دخولها وخروجها (Walton et al., 1979).

ب- التوحيد القياسي Standardization. بما ان التغيرات البيولوجية لا يمكن تجنبها لذا أصبح من الضروري إيجاد نظام قياس يشمل النبات، الكائن الممرض وتحضيرات السم المختلفة لكونها ضرورية لمقارنة نتائج التجارب المختلفة من المختبرات المختلفة.

قيم Mitchell (1978) الفيزيولوتوكسين كمياً باستخدام مجموعة تتألف من 13 عزلة بكترية (pv. Phasedicola) إلاّ انه فحص 3-4 عزلات في كل تجربة، أي انه احتاج إلى إجراء 3 تجارب مختلفة. ولأجل مقارنة نتائج العزلات (13) بصورة مباشرة فقد استخدم احد العزلات (No. 4612) كمرجع في كل تجربة، وقد اوجد مسبقاً بان العزلة No. 4612 تنتج سم بمعدل حوالي 2065 مايكروغرام/ لتر. وعليه عند إجرائه للتجارب الثلاث يجد العامل الذي يختلف فيه إنتاج العزلة No. 4612 عن معدلها 2065 مايكروغرام/ لتر ويستخدمه لتصحيح إنتاج العزلات الأخرى. وبذلك فقد اوجد مقارنة مضبوطة جداً بين العزلات.

عند إجراء تقييم كمي لسم في نموذج حاو على شوائب فلا بد من الاعتماد على مصدر قياسي اوجد مسبقاً يتضمن السم النقي جدا ويستخدم لأجل المقارنة(Hewitt, 1977) ولأجل زيادة الدقة فلابد من إجراء منحنى قياسي للمادة النقية في كل تجربة مع المادة المراد تقييمها ولابد من وجود اصطلاح قياسي للتعبير عن فعالية السم للمقارنات المباشرة فالسموم ذات التركيب الكيميائي المعروف والثابت يستحسن استخدام المولارتي Molarity الجزيئي. من المصطلحات المستخدمة للتعبير عن فعالية السم هي الوحدة Unit . فقد عرفت وحدة نشاط السيرينجيومايسين، على أنها الكمية الموجودة في 10 مايكرولتر والتي تثبط نمو فطر G. Candidum كلياً (Sinden et al., 1971). وعرفت وحدة فعالية التابتوكسين على أنها تلك الكمية التي تسبب منطقة منع نمو (Inhibition zone) لبكتيريا E. Coli بقطر 25 ملم شكل 7-3 . عرف Patil وجماعته (1972) وحدة فعالية الفيزيولوتوكسين بأنها تلك الكمية اللازمة لتثبط فعالية إنزيم الاورنثين كاربامیل ترانسفيريس بنسبة 50٪.

الفعالية النوعية Specific activity لتحضيرات السم يعبر عنها أما وحدة/ مايكروغرام وزن جاف (Unit/ug dry/wt) أو مايكروغرام وزن جاف/ مل (ug dry wt/ml) لإحداث تأثير معلوم. وإذا كانت الشوائب ضمن التحضير الواحد للسم كبيرة فان مستوى النشاط النوعي يكون قليلاً وكلما زاد مستوى النشاط النوعي كان السم بصورة أنقى.

يؤكد الباحثون على ضرورة البحث في العلاقة بين الجرعة والاستجابة لها حيث يجب تعين هذه العلاقة، ففي بعض الحالات تكون طردية ولكن لمدى قصير جداً. وفي حالات أخرى تكون العلاقة غير خطية ولكن ممكن تحويلها إلى خطية بواسطة التحويلات الإحصائية. وفي كل هذه الحالات فان مدى الجرعات يجب ان يعطى عدداً من مضاعفات المراتب (أحاد، عشرات، مئات أو نصف، ربع، ثمن، الخ...) لا بأس به (Roberts & Boyce, 1972; Yoder et al., 1977).

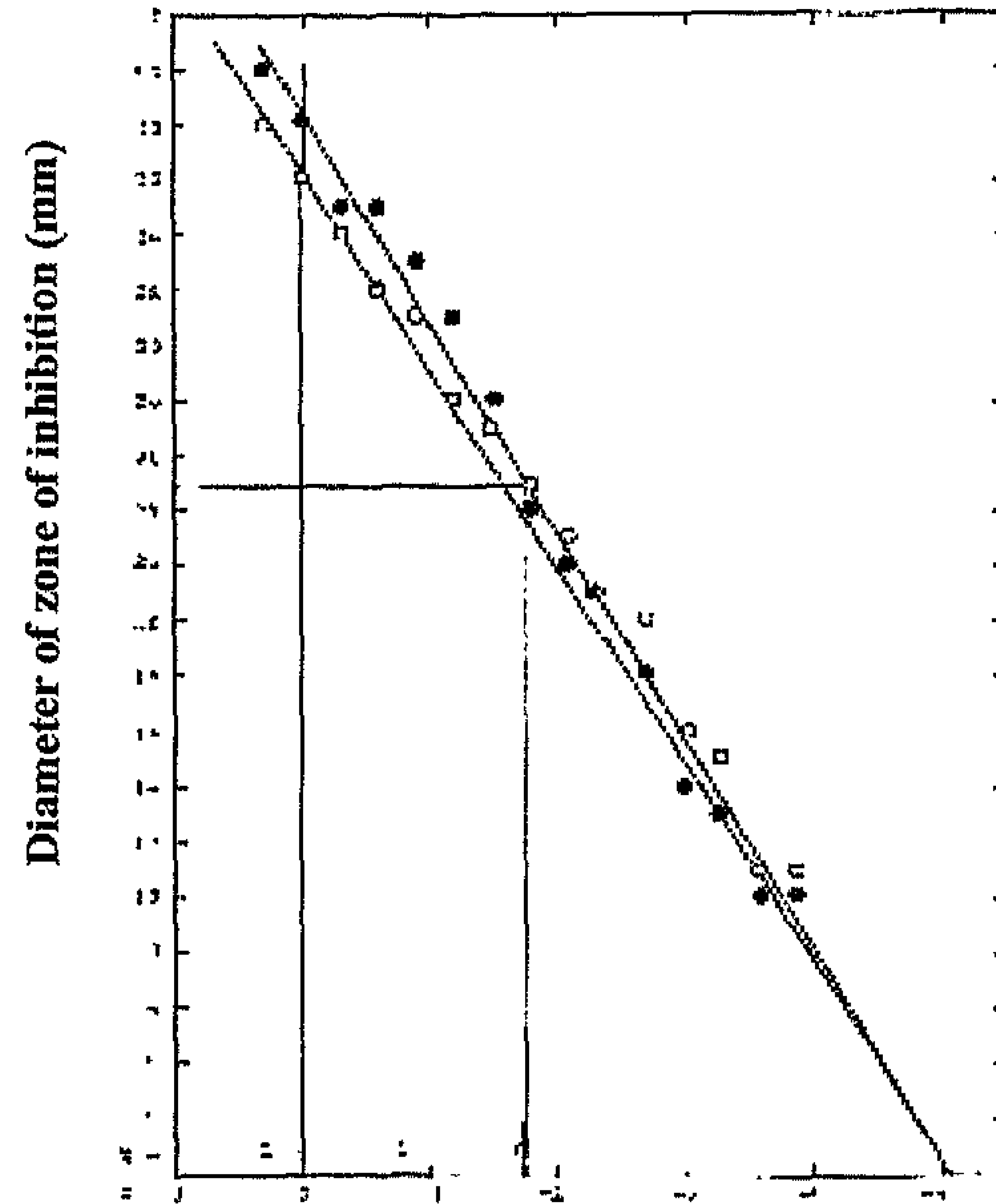
جـ- نماذج السيطرة Controls

تعتبر نماذج السيطرة ضرورية جداً لأي اختبار إحيائي مستخدم لتشخيص السموم. وتشمل نماذج السيطرة على مستوى السم نفسه ما يلي: (1) نماذج لنظير السم الخامل أو تحضيرات لسم نشط وتعامل بمعاملات خاصة لأجل فقدان النشاط البيولوجي للسم.

(2) مزارع العزلات البكتيرية الغير مولدة للسم أما على مستوى النبات نفسه فلابد من إجراء مقارنات بين النبات الحساس والنبات المقاوم خصوصاً فيما يتعلق بالسموم التي تصيب مضيقاً خاصاً (Scheffer, 1976).

وأخيرا ولأجل الدقة في العمل والتشخيص لابد من استخدام أكثر من نوع من الاختبارات الإحيائية لقياس نشاط سم معين. لأن الاختبارات المتعددة تزيد الثقة بتشخيص السم وفعاليته.

7



شكل 7-3 : العلاقة بين منطقة منع نمو (Inhibition zone ○ ، ● بمكررين) وتركيز التابتوكسين في الاختبار الإحيائي باستخدام بكتيريا *Escherichia coli*

وحدة واحدة/ مل تعرف على أنها كمية السم المسببة لمنطقة منع نمو بكتيريا الـE. Coli بقطر 25ملم

$Y = Mx + C$

$Y = 7.232x + 37.614$

Correlation factor (R) = 0.9832

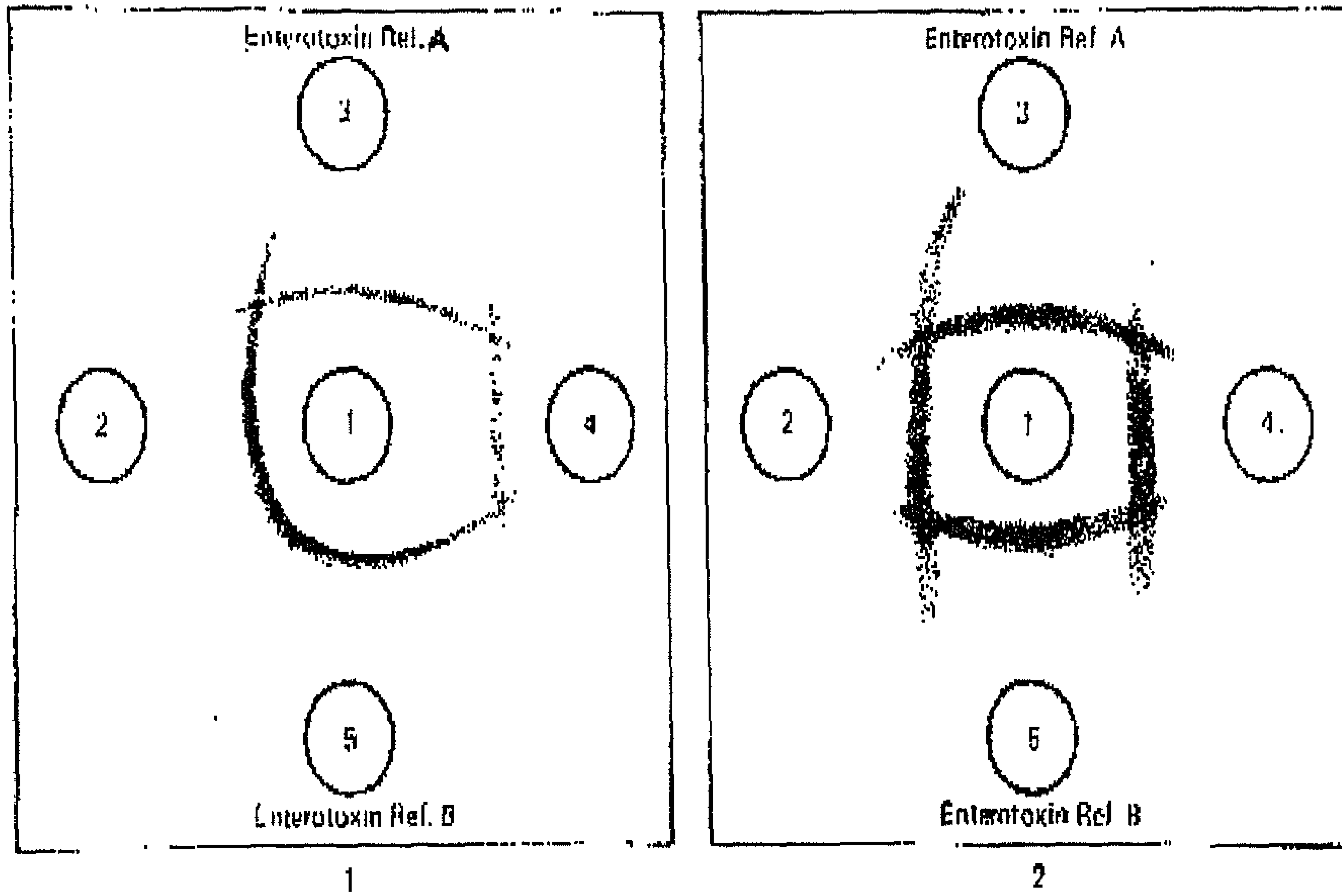
0.3184(4-25)

No. Units/ml = E

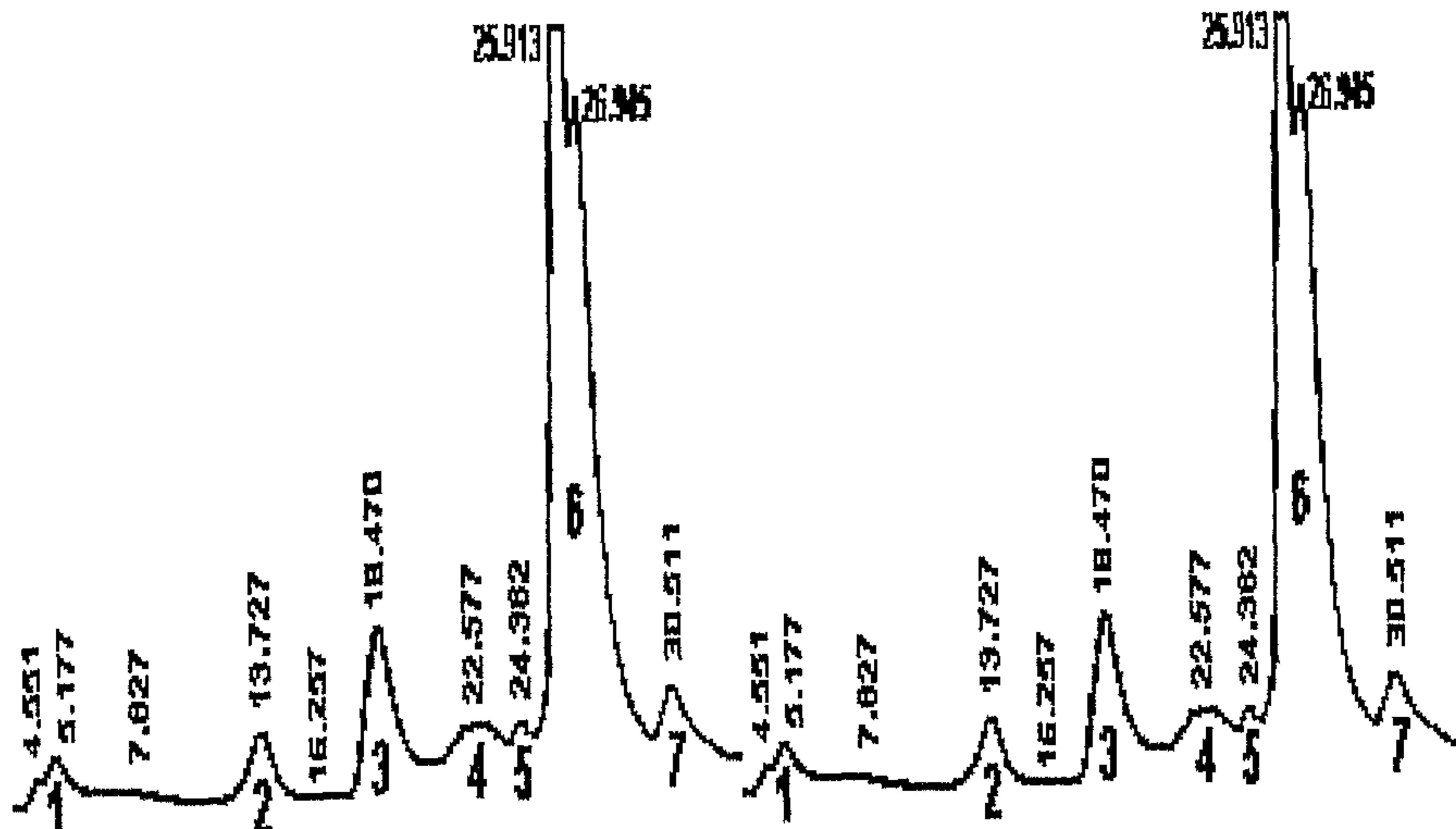
Where Y is the diameter of the zone of inhibition (mm) $38 > y > 10$

يحضر مزرعة للـE. Coli في طور النمو اللوغارتمي. يرسب المزرعة بجهاز الطرد المركزي (10.000 دورة في الدقيقة، 10 دقائق، 4م°) يغسل الراسب بالماء المقطر وتعاد عملية الطرد المركزي. تعلق الخلايا بالمحلول الفسيولوجي لتعطي كثافة ضوئية optical density = 0.2 تحت طول موجي 500mm. يخلط حجم متساوي من هذا المعلق مع أجار (0.7٪) بدرجة 42م° . ويصب 10مل منه على طبق بكتيري حاوي على وسط أجار M_9 تعمل حفر Well في سطح الاجار وتوضع تراكيز مختلفة من التابتوكسين بحجم 0.1 مل في كل حفرة على حدة. ثم توضع الأطباق بدرجة 37م° لمدة 18 ساعة. تقاس منطقة منع النمو بعد ذلك.

وجد من الحسابات ان الوحدة الواحدة لنشاط التابتوكسين تعادل 6.25 نانامول (n. mole) أي 6.25×10^{-3} مايكرومول (µ. mole).

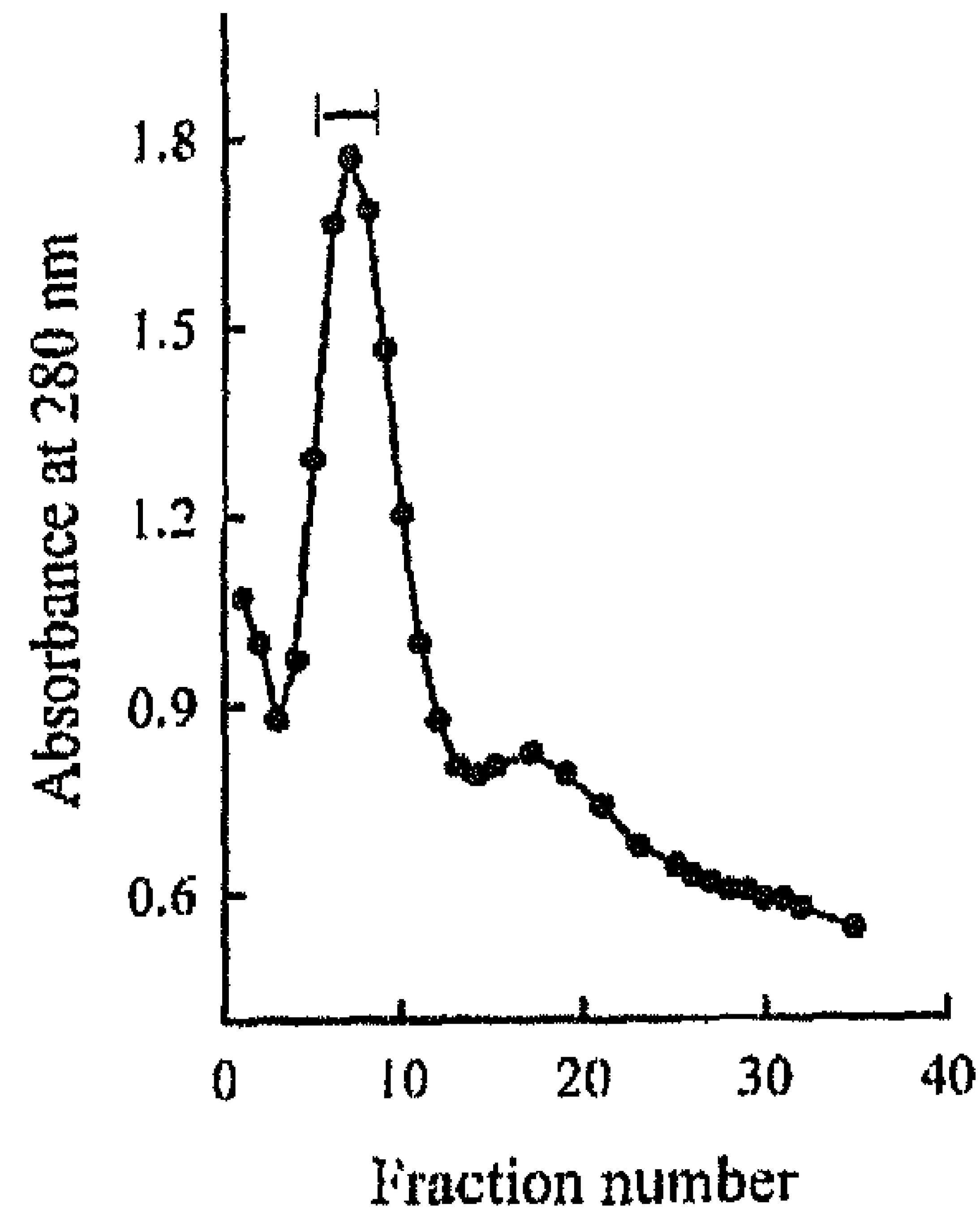


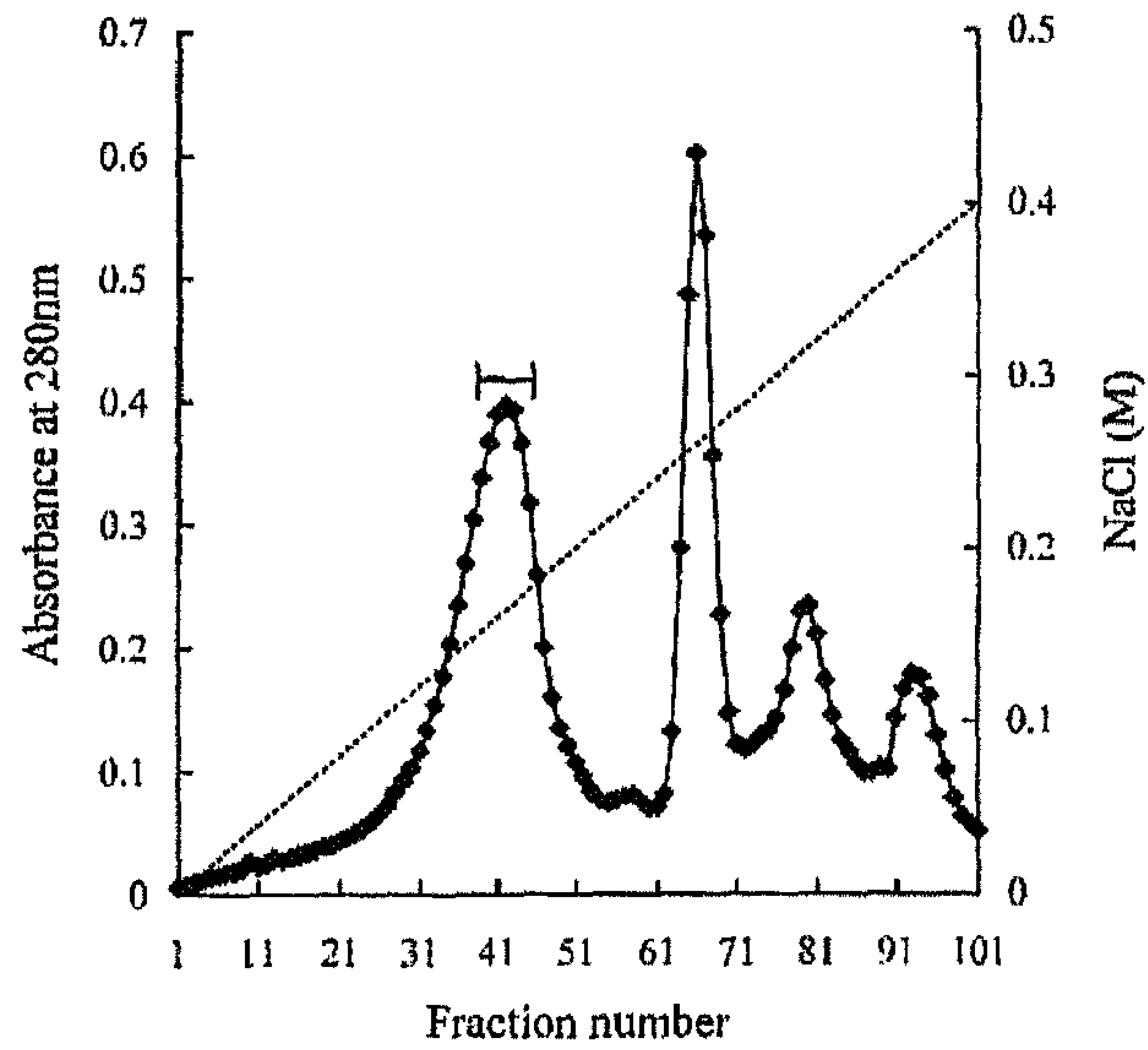
إحدى الطرق المناعية للتشخيص تستخدم مع السموم البكتيرية البروتينية
http: www.cfsan.fda.gov



أحدى طرق تحليل وتنقية السموم بطريقة HPLC
http:/www.scielo.br./imag

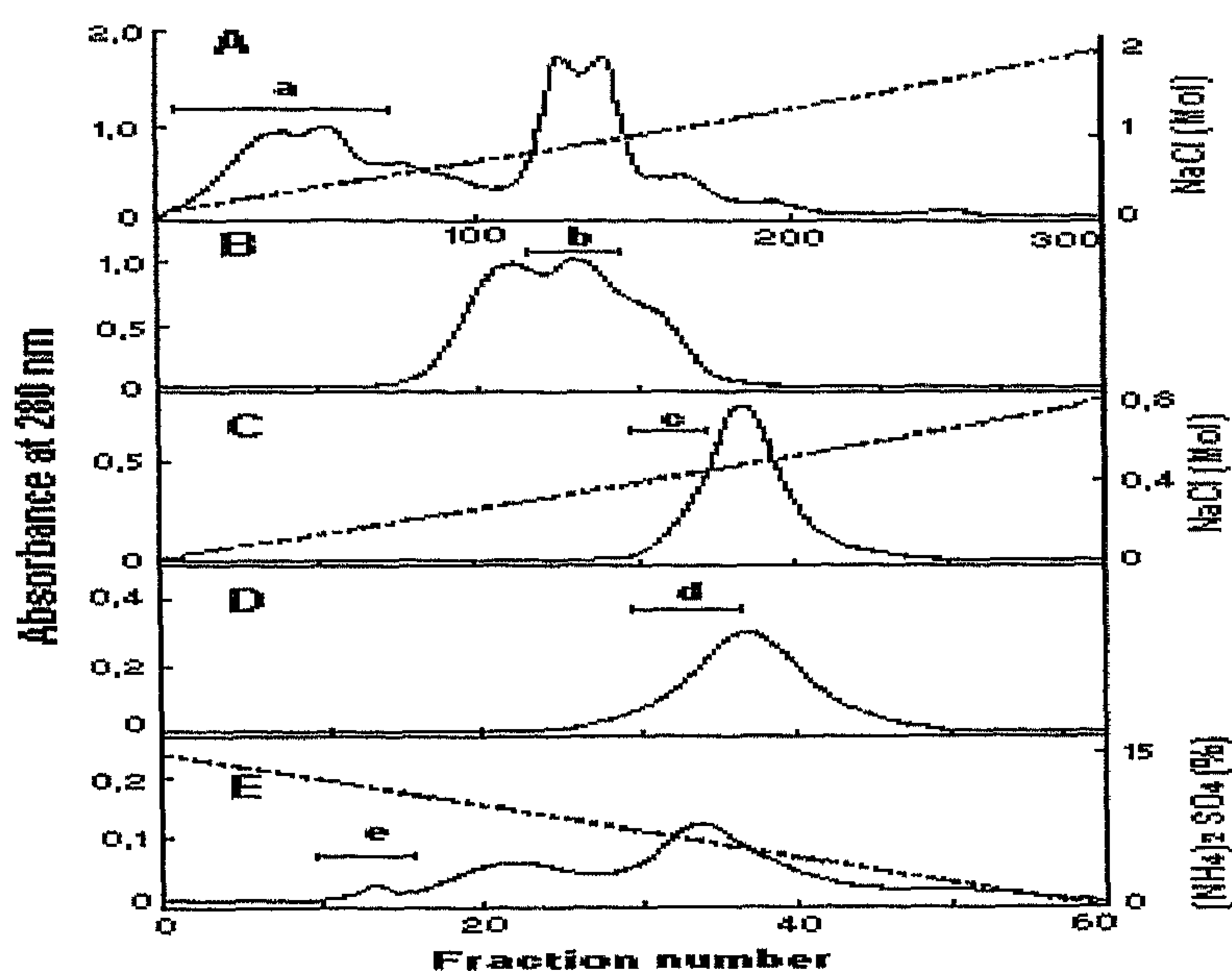
7





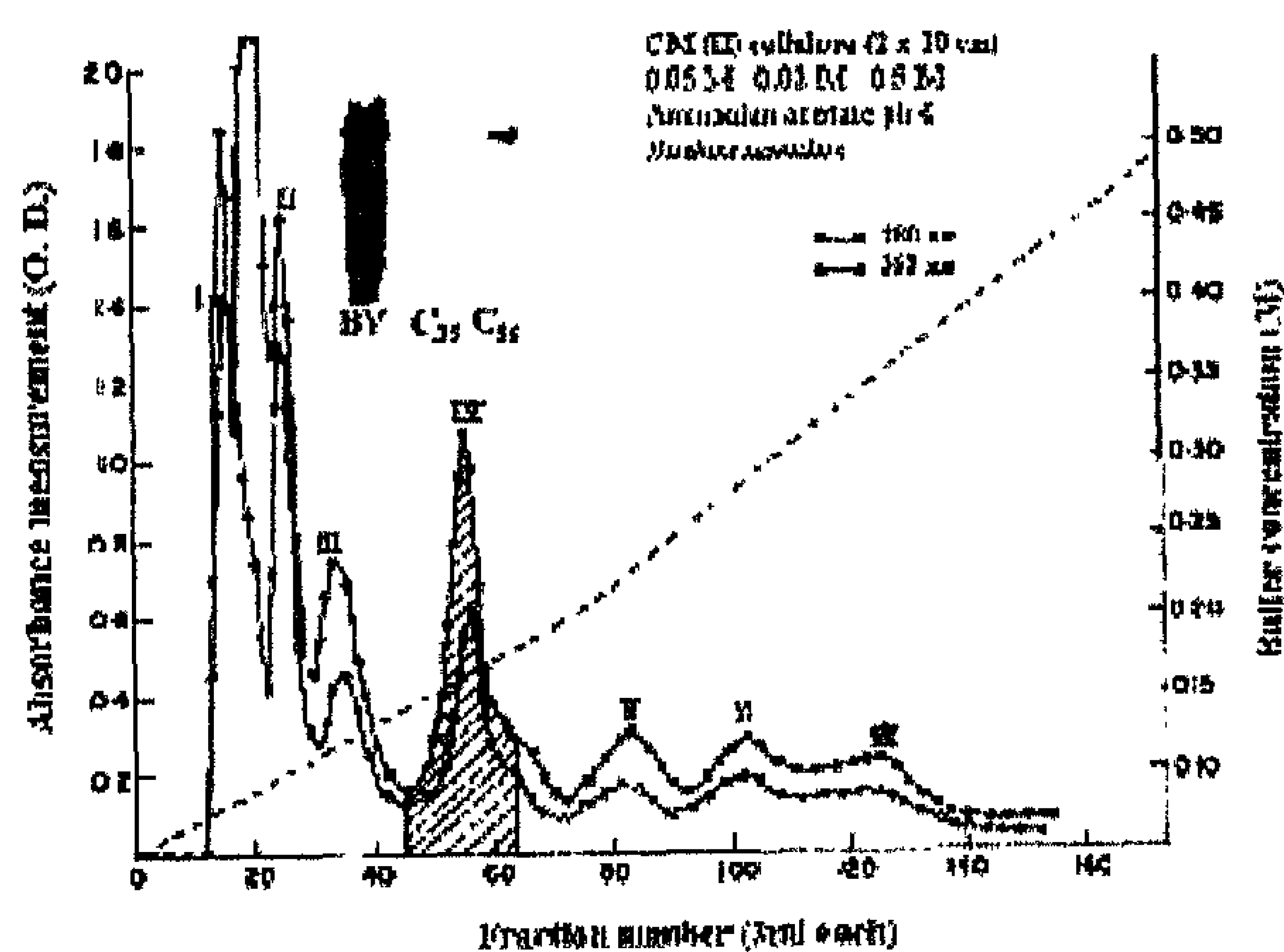
تقيم وتنقية السموم بطريقةIon exchange chromatography

http:/biochemj.org/bi/338



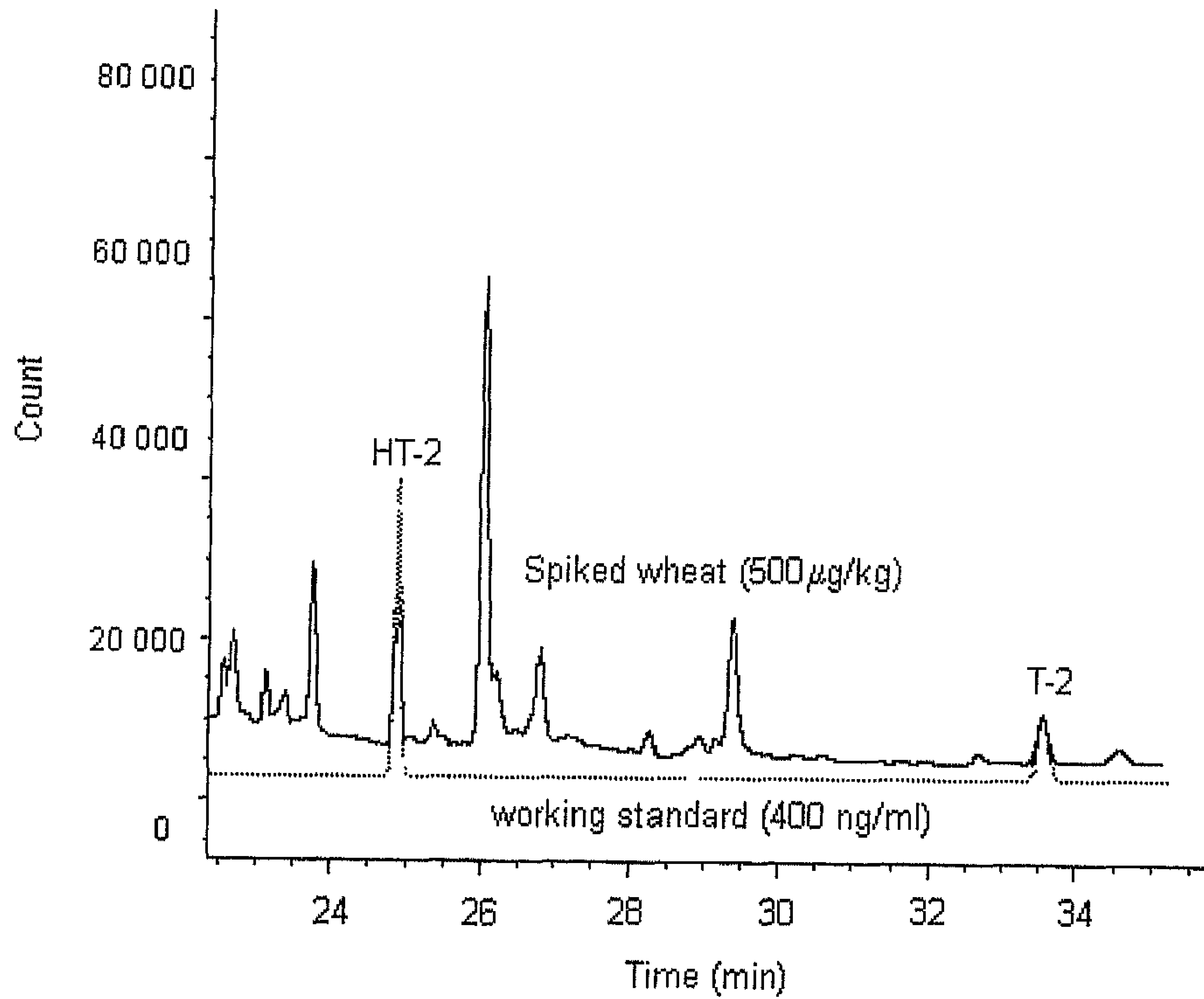
تنقية وتقييس فعالية السموم بتقنية Column chromatography باستخدام أنواع مختلفة من الGel

www.scielo./br/scielo.php

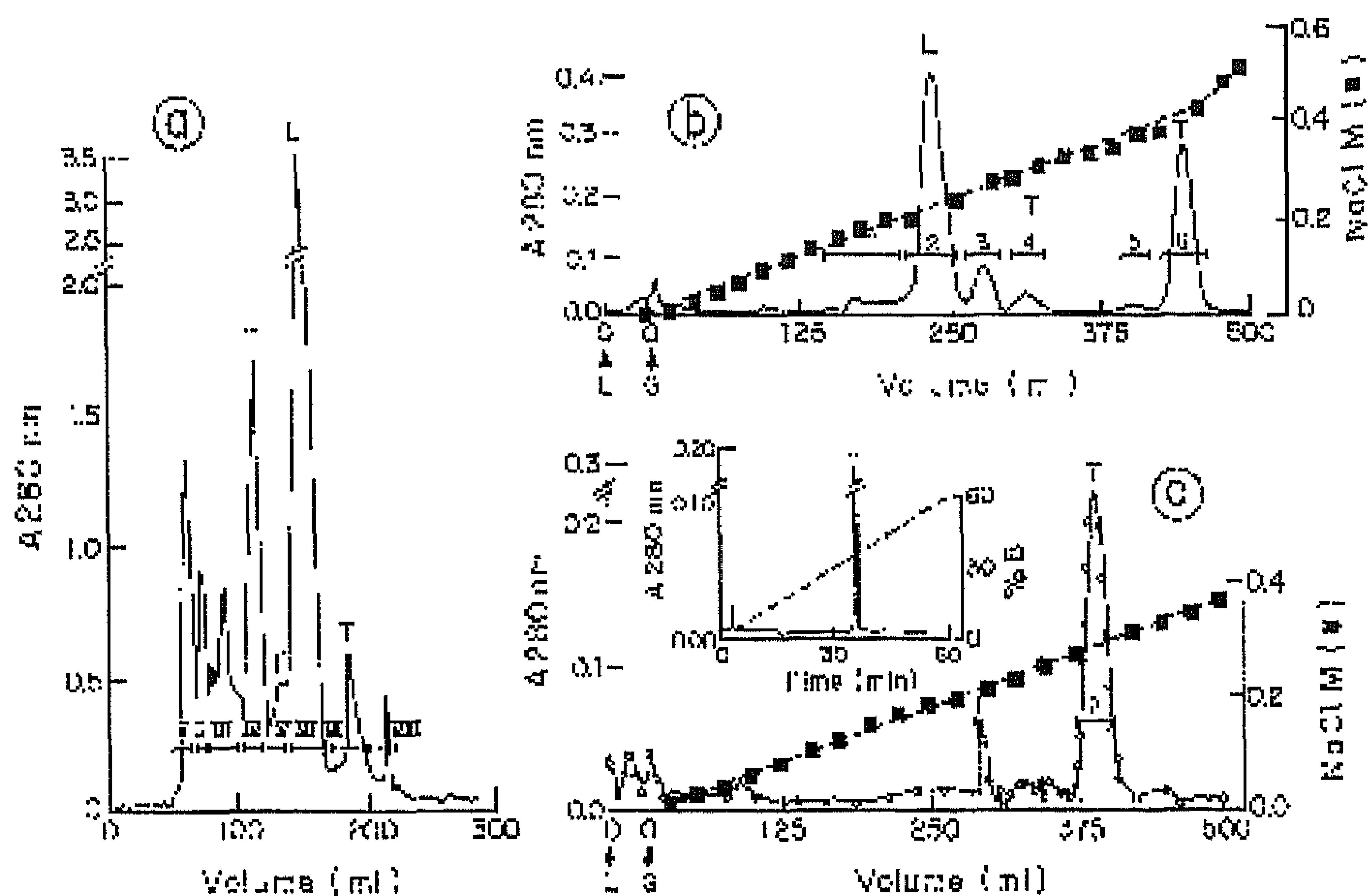


طريقة مزدوجة (الكروماتوكرافى والهجرة الكهربائية) لفصل وتقيم احد السموم البايولوجية

7



فصل وتحليل السموم و مكوناتها بطريقة Gas chromatography
http:/ www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono



مخطط يوضح فصل وتجزئة السموم

الفصل الثامن

8 السموم البروتينية البكتيرية (السموم الخارجية)

Bacterial Protein Toxins (Exotoxins)

1. المقدمة

Introduction

إن فكرة كون البكتيريا المرضية تسبب تأثيراتها الضارة على المضيف نتيجة ما تكونه من مواد سامة، قديمة وتعود إلى قِدم نشوء علم دراسة البكتيريا. ففي عام 1872م اقترح العالم Klebs ان المواد والتي هي من أصل جرثومي وأطلق عليها مواد التعفن القيحي (Sepsins) هي المسئولة عن الآلام الناتجة عن إصابات بكتيريا المكورات العنقودية. كما عزا Koch في 1884م مرض الكوليرا إلى حالة تسمم وبعده Loeffler في 1887م لاحظ أن الحالات المميتة الناتجة عن بكتيريا الخناق والمتميزة بخلو الجسم من البكتيريا المرضية عدا منطقة الحنجرة (منطقة تكوين الغشاء الكاذب) التي تمثل الموقع الأولي للضرر أو التلف الناتج عن الإصابة بهذه الجرثومة. وبذلك أستنتج Loeffler بان السم المفرز في موقع الإصابة الأولية لابد من انه قد سرى في الدم. كما برهن كل من Roux و Yersin عن وجود مادة في راشح مزرعة معقمة من خلايا بكتيريا الخناق *Corynebacterium diphtheriae* والتي تسبب عند حقنها في الحيوانات (خنازير غينيا، الفئران والحمام) أعراضا مرضية مشابهة لما تسببه خلايا عصيات بكتيريا

الخناق والتي بالنهاية تؤدي إلى موت الحيوانات. وقد استخدم هذان الباحثان مصطلح سم (الذيفان) للتعبير عن المواد البكتيرية السامة (Bacterial poisons). كما أوضحا بان الإدرار المأخوذ من الأطفال المصابين بهذه الجرثومة قبل وفاتهم، بقليل يحتوي على مواد كافية لأن تسبب الهلاك في حيوانات خنازير غينيا عند حقنها بها، بعد أن تسبب أعراضا مرضية مشابهة تماماً عن تلك الناتجة من حقن راشح مزرعة البكتيرية. وهذا يشير إلى ان احتمالية كون السم الموجود في راشح النمو البكتيري هو نفسه المنتج في حالة الإصابة بالمرض طبيعياً.

ان هذه الملاحظات قد أعطت شواهد حقيقية لإثبات فكرة ان الأمراض البكتيرية ممكن ان تفسر على أساس ما تفرزه من مواد سمية ذاتية. وقد تمكن، وعلى انفراد، كل من Faber و Breget و Frankel في عام 1889م من اكتشاف سم الكزاز وبعدهم اكتشف Van Ermengen عام 1896م السم البوتيوليني (Botulinum toxin) ورافق هذه الفترة اكتشاف Behring و Kitasato المهم عام 1890م المتضمن تحقيق المناعة ضد الخناق والكزاز والذي يطلق عليه اليوم بالتمنيع (Immunization). مما حفز تطلعات وشجع آمال الباحثين لتحقيق تمنيع نوعي ضد المواد السامة لكل الأمراض المعدية(Boyd & Hoerl, 1986; Green wood *et al.*, 2007).

2. طبيعة السموم البروتينية البكتيرية

The nature of bacterial protein toxins

لقد تم تشخيص نوعين من السموم البكتيرية اعتماداً على التركيب الكيميائي لهذه السموم. وهنا سيتم التركيز على السموم البروتينية البكتيرية، والتي هي عبارة عن بروتينات ذائبة تفرز من قبل الأحياء المجهرية خلال النمو وكنواتج أثناء النشاطات الخلوية الايضية. ولا بد من الإشارة إلى انه ليس كل

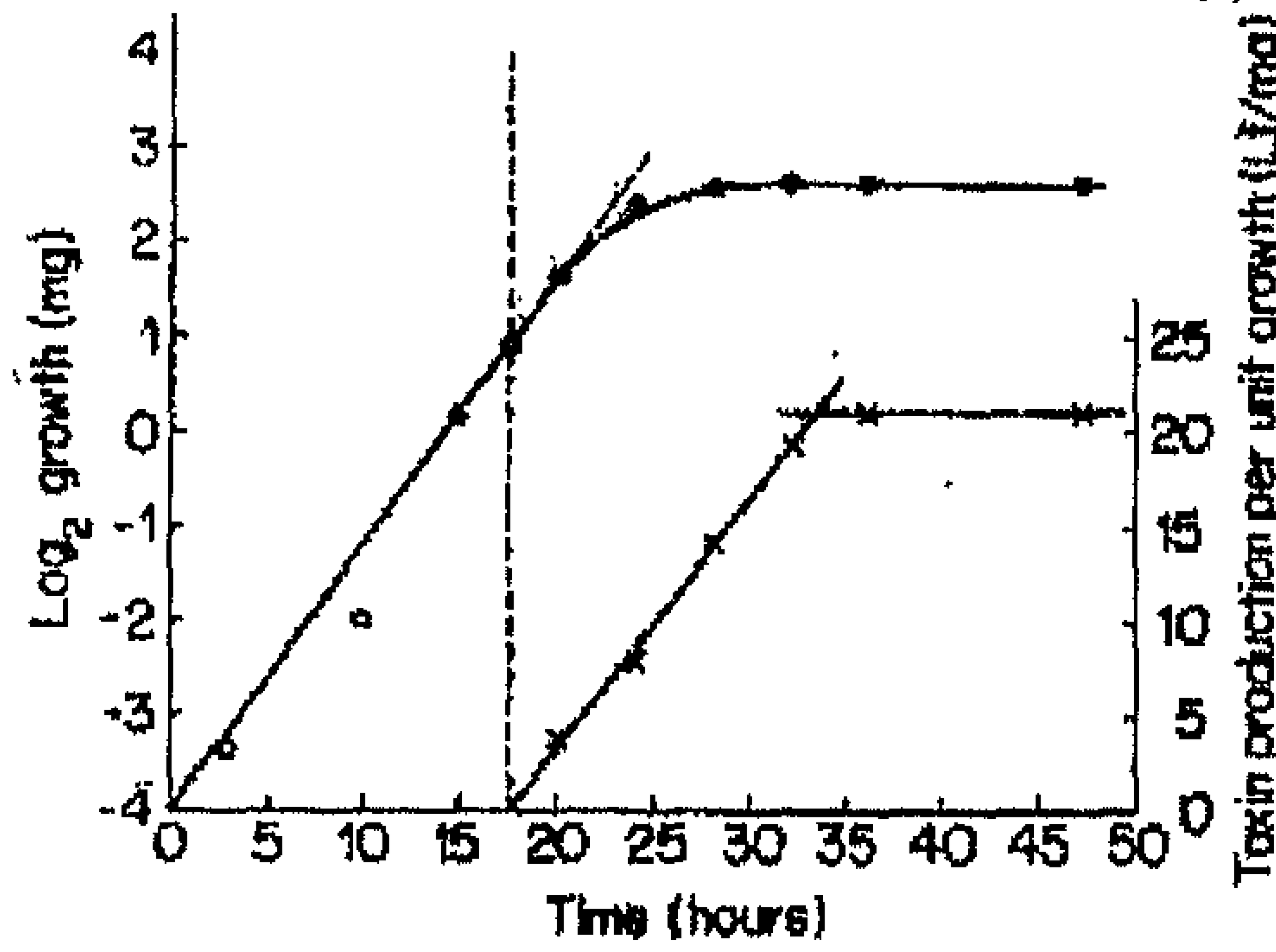
هذه السموم تفرز إلى خارج الخلايا، حيث لوحظ، أحيانا بان الكميات الكبيرة منها تتواجد داخل الخلايا كما في محيط الوسط الزراعي المستخدم لتنمية الخلايا، وتتحرر نتيجة لتحلل الخلايا ذاتياً. فعلى سبيل المثال عند استخلاص وتنقية السم البوتيوليني نوع E فان خلايا الكائن المرض تستخدم كمصدر للحصول على السم أكثر من الوسط الزراعي المنماة فيه. إن عملية إنتاج السم البروتيني تكون نوعية ومتخصصة لكل نوع جرثومي انظر الشكل (8-1)، فالسلالات الشديدة الضراوة أو الفوعية تنتج السم بشكل ثابت أو تنتج مديات من السموم بينما السلالات العديمة الضراوة أو الفوعية تكون غير ذلك. تنتج معظم السموم البروتينية من قبل بكتيريا الموجبة لجرام. وتشمل أنواع بكتيريا الخناق Corynebacterium spp ، بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية Staphylococcus aureus ، بكتيريا المكورات المسبحية القيحية Streptococcus pyogenes ، عصيات الجمرة الخبيثة Bacillus anthracis والأنواع المرضة لجنس الكلوسترديا .Clostridium spp كذلك هناك أنواع من بكتيريا الكرام السالب (راجع الفصل التاسع) تنتج السموم البروتينية وتشمل بكتيريا الكوليرا Vibrio cholerae وبكتيريا الشجيلا Shigella dysenteriae وبكتيريا السعال الديكي Bordetella pertussis وبعض أنواع بكتيريا القولون المعوية المرضة Entero pathogenic E. coli . ان السموم البرويتينية لا تتميز عن السموم الأخرى كونها من أصل أحيائي مجهري (من الأحياء المجهرية) فقط بل لكونها نشطة جداً في التخافيف العالية أكثر من بقية أنواع السموم الأخرى (Todar, 2007).

لقد قورن نشاط تخافيف بعض السموم بفعالية المادة الكيماوية الاستركنين. على سبيل المثال جرعة من السم البوتيوليني نوع A تقدر بـ 2.5×10^{-5} مايكروغرام تكون قاتلة للفئران وبذلك يكون نشاطها مليون مرة أكثر مقارنة

بنشاط مادة الاستركنين*. ان هذا المستوى العالي من النشاط يميز هذا النوع من السموم عن سموم الدهنيات العديدة التسكر (Lipopolysaccharides) والتي تسمى بالسموم الداخلية (Morrison and Ryan, 1992 ; Forbes et al., 2002)

ان السموم البروتينية تشابه الأنزيمات من حيث طبيعتها البروتينية، عدم ثبوتيتها، نشاطها البيولوجي العالي وكذلك تخصصها في العمل أي تخصصها بنوعية المادة الخاضعة لفعلها (Substrate).

وكون هذه السموم مادة بروتينية فهي ذات طبيعة مستضدية (إنتيجينية) وحسب هذه الخاصية أو الصفة المميزة يشار إليها بالمواد السامة المستضدية ذات الأصل الإحيائي الجهري، وعلى أساس هذه الصفة التخصصية يتم التميز بين السموم المتقاربة جداً استناداً إلى الاختلافات المستضدية بينها. وبواسطة مضادات السموم النوعية (Specific antitoxin) يمكن معادلة السمية الناتجة عن هذه السموم، داخل الجسم الحي in vivo (Alouf and Popoff, 2006).



شكل 8-1 : منحنى النمو(●) وإنتاج السم (×) باستخدام العزلة diphtheriae B.W.8 C. في الحاضن الهزاز بدلالة الزمن . (linton, 1986)

---

* الاستركنين (Strychnine) : مادة سامة تستخلص من بذور Strychnos تستخدم للقضاء على القوارض (1:130.000 MLD orally in mice)

ومن المحتمل ان مضادات السموم المتماثلة النوع (Homologous antitoxin) لا تثبط كلياً النشاط الأنزيمي لهذه السموم (البروتينات) خارج الجسم الحي *in vitro* وهذا يشير إلى ان موقع المحدد المستضدي (Antigenic determinant) متميز عن جزء المحدد الأنزيمي (Enzyme determinant) لهذا البروتين وان عملية معادلة النشاط السمي والأنزيمي تعتمد على مقدار المسافة بين هذين الموقعين المهمين. على اية حال فان السم يتم معادلته كلياً بواسطة مضادات السم النوعي داخل الجسم الحي دائماً وليس كذلك خارج الجسم الحي، مما يشير إلى وجود عوامل أخرى تلعب دوراً في هذه المعادلة داخل الجسم الحي.

ان السموم البروتينية هي مواد غير ثابتة وهذا يؤدي إلى فقدان نشاطها السمي بمرور الوقت دون ان تفقد نشاطها المستضدي. وقد أطلق مصطلح السم الموهن (Toxoid) على تلك المادة الفاقدة للنشاط السمي والمحتفظة بالنشاط المستضدي.

ان عملية تحويل السموم النشطة إلى سموم موهنة (مضعفة) يتم باستخدام مواد مختلفة منها، الفورمالديهايد، الأيودين، حامض الاسكوربيك، انزيم البيسين Pepsin* ، حامض النتروز والكيتونات.

يستخدم اعتيادياً الفورمالين بنسبة 0.1-0.2% لهذه العملية حيث يحفظ مع السم النشط بدرجة 37 درجة مئوية لمدة عدة أسابيع بدرجة حموضة PH 9-6 ، وينتج عن ذلك السم الموهن (Toxoid) الذي يستخدم لعمليات التمنيع خصوصاً ضد مرض الكزاز والخناق وبعض أمراض الكلوستيريديا.

---

* البيسين (Pepsin): الانزيم الذي يقوم بالتحليل المائي للبروتينات ولمتعدد الببتيدات.

ولكون السموم غير ثابتة فان عملية تقيـيمها بـصورة معتمـدة لابـد مـن استخدام مواد ثابتة هـي مـضادات الـسموم (Antitoxins) وان كميـة مـضادات السموم المطلوبة لمعادلة السموم (والتي تعين بواسطة فحص السمية داخل جـسم حيوانات التجارب) تقيس نشاط هذه التحضيرات مـن الـسموم، كمـا ان نـسبة الخطأ في هذا الفحص هي نسبة مقبولة سيما وان مضادات السموم ستتفاعل مع السموم النشطة ومع السموم الموهنة الموجودة في نفس التحضير.

3. النشاط البيولوجي للسموم البروتينية

Biological activity of protein toxins

مثلما تهاجم الأنزيمات المواد الخاضعة لعملها (Substrate) كذلك الـسموم البروتينية البكتيرية متخصصة جداً في نوعية المواد التي تهاجمها وتخضعها لفعلـها. كما هو معروف ان المواد التي تعمل عليها السموم نوعية لكل سم معين وممكـن أن تكون هذه المواد جـزءً مـن تركيـب خلايـا الأنـسجة، الأعـضاء أو سـوائل الجسم. علماً بأن موقع الضرر الذي يصيب الجسم من جراء الـسم يمثـل موقـع المادة الخاضعة لعمل ذلك السم. وعليه فان المصطلحات التي نطلقها على بعـض السموم مثل سم الأعصاب (Neurotoxin)، السم المعوي (Enterotoxin)، الـسم المحلل لكريات الدم الحمراء (Hemolysin)، السم المحلل لكريـات الـدم البيـضاء (Leucocidin) والسم التالف للخلايا (Cytotoxin)، تشير إلى موقع الهدف المحدد لذلك السم (جدول 8-1).

كما أن هنـاك بعـض الـسموم تفرزهـا أجنـاس مثـل المكـورات العنقوديـة (Staphylococci) والمـسبحات العنقوديـة (Streptococci) وأنـواع مـن جـنس الكلوسترديم (Clostridium)، لها نشاط سمي واسـع ضـد خلايـا الأنـسجة ممـا

يؤدي إلى الموت الموضعي للنسيج (Necrosis) وفي هذه الحالة يكون ناشئاً عن سبب غير محدد أو معين.

8

هناك عدد من البكتيريا الممرضة تنتج الأنزيمات المحللة لمادة الدهنية المفسفرة (Phospholipases) والتي لها القدرة على فلق المادة الدهنية المفسفرة (Phospholipids) بطرق مختلفة. تعتبر المادة الدهنية المفسفرة من أهم مكونات تركيب غشاء الخلية وعليه فان أي ضرر أو تلف يصيبها يؤدي بالنتيجة إلى تدمير الخلية من خلال فقدانها لمحتوياتها الخلوية. فمثلاً في حالة حصول ذلك لكريات الدم الحمراء فان عملية تحلل الدم ستكون النتيجة الحتمية لذلك.

ليست كل البروتينات البكتيرية التي تفرزها الخلايا البكتيرية خارجياً تسبب تلفاً لخلايا الأنسجة مما يجعلها موضع جدال حول تسميتها أو عدم تسميتها بالسموم على الرغم من ان لها دوراً متميزاً أو محدداً في حدوث المرض. ان قسماً من هذه المواد تهاجم المكونات الذائبة لسوائل الجسم، على سبيل المثال الأنزيم المخثر للدم (Coagulase) الذي تنتجه خلايا المكورات العنقودية الممرضة والذي يحول مادة مولد الليفين (Fibrinogen) أو ما يسمى أحيانا بمنشأ الليفين، إلى مادة الليفين والتي تكوّن الخُراج (Abscess) في تركيب جدار الخلايا.

القسم الآخر من هذه المواد ذات الطبيعة الإنزيمية تهاجم المواد الرابطة بين الأنسجة، مثل حامض الهايلويورونك (Hyaluronic acid) والذي يربط الخلايا مع بعضها لتكوين نسيج معين مثال ذلك الأنزيم المحلل لحامض الهايلويورونك (Hyaluronidase) أو الأنزيم المهاجم لمادة الكولاجين* (Collagenase) الرابط لألياف العضلات (Harrington, 1996). كما ان هناك بعض الإنزيمات المحللة

* الكولاجين (Collagen) : المادة البروتينية في النسيج الضام أو العظام.

للمـــواد البروتينيـــة مثـــل أنـــزيم الـــستربتوكاينيز (Streptokinase) وأنـــزيم الـــستافيلوكاينيز (Staphylokinase) اللـــذان يحـــولان مـــادة مولـــد البلازمـــوجين (Plasminogen) الغير نشطة إلى انزيم البلازمين (Plasmin) النشط الـــذي يهـــضم مادة الليفين وبالتالي يمنع تخثر الدم. أن الأنزيمات البكتيرية الـــتي تلعـــب دوراً في تكسير أو تحطيم الأنسجة أو التي تتداخل مع عملية أو ميكانيكيـــة تخثـــر الـــدم يُشار إليها بعوامل الانتـــشار (Spreading factors) وذلـــك كونهـــا تـــسهل عمليـــة انتشار الأحياء المجهرية المرضة بين الأنسجة من موقع الإصابة الأولـــي، كمـــا في حالـــة الإصـــابة بـــالمكورات المـــسبحية المـــسببة لمـــرض الحُمـــرة أو التهـــاب الجلـــد (Erysipelas) في الإنسان،

(Lottenberg, *et al.*, 1994; Bhakdi,1991,1996; Harrington,1996; Song *et al.*, 1996; Songer, 1997; Tomita and Kamio,1997)

وتمثل بعض انواع السموم البروتينية البكتيرية الذائبة ما يسمى بالإنتيجينات القويـــة جـــداً (super antigens) كالـــسم المعـــوي enterotoxin لبكتيريـــا *staphylococcus aureus* والـــسموم المـــسببة للـــصدمة toxic shock syndrome والسم المسبب للالتهابات الجلدية وبعض أنواع سموم الـ Streptoccous حيـــث تلعب هذه السموم دوراً مهمـــاً في تحفيـــز وتنـــشيط الخلايـــا المناعيـــة نـــوع Tcell وتكاثرها مما يؤدي إلى حدوث استجابة مناعية سريعة (Goldsby *et al.*, 2003).

4. قابلية استجابة المضيف للسموم البروتينية

Host susceptibility to protein toxins

8

لابد من الإشارة بان كل المضايف ليست لها نفس قابلية الاستجابة لسم معين. فهناك مثلاً خنازير غينيا تكون حساسة جداً عند تعرضها لسم الخناق (Diphtheria) بينما تظهر الفئران مقاومة شديدة ضده. كما ان بين أنواع الحيوانات المختلفة التي تكون لها قابلية استجابة لنفس السم هناك اختلافات بالنسبة للاستجابة لكمية الجرعات المستلمة من قبل الحيوانات لإظهار نفس الأعراض. حيث نجد مثلاً ان حيوانات خنازير غينيا تكون 1000 مرة اكثر حساسية عند تعرضها، إلى نفس التحضير من السم العصبي المستخلص من بكتيريا *Shigella dysenteriae* من الفئران وتكون 6000 مرة أكثر حساسية، من الفئران أيضا عند تعرضها للسم البوتيوليني (Botulinum toxin).

إن مثل هذه الملاحظات لا بد ان تجري على نفس الوجبة التحضيرية للسم سيما وان هناك اختلافات بين شدة السمية للوجبات التحضيرية المختلفة لنفس السم. وهناك فروقات معنوية بين الأنواع المختلفة للمضايف وعلى المستوى الخلوي. فمثلاً نفس الوجبة التحضيرية للإنزيم المحلل للدهون الفسفورية (Phospholipase) أو المحلل للدم (Hemolysin) يحلل كريات الدم الحمراء من مضايف (حيوانات) مختلفة بمعدل سرعات مختلفة. كذلك نجد ان سُم ألفا (α Toxin) المأخوذ من المكورات العنقودية يكون نشاطه المحلل لكريات الدم الحمراء في الأرانب أكثر 100 مرة من تأثيره على كريات الدم الحمراء للإنسان.

في ما عدا السموم المعوية (Enterotoxins) فان قياس شدة النشاط السمي لأي سم يجب ان تقاس من خلال إعطائه عن أي طريق آخر غير طريق الأمعاء في الحيوانات التي تظهر استجابة لهذه السموم. إلاّ إن هذا الافتراض قد يقود إلى

استنتاج خاطئ وهو إن السموم تكون غير نشطة عند إعطائها عن طريق الفم، في حين نجد سم الخناق وسم الكزاز مثلاً فعالة عند إعطائها عن طريق الفم على افتراض إنهما يمتصان من قبل جدار البلعوم، وعلى أية حال فان الجرعة المؤثرة لهذه السموم عن طريق الفم يجب أن تكون آلاف المرات اكبر من تلك المعطاة عن طرق الحقن الأخرى.

جدول 8-1 : النشاط البيولوجي لبعض السموم البروتينية البكتيرية (Linton, 1986)

المصدر	اسم السم	المادة الخاضعة لعمل السم	النشاط
C. diphtheriae	Schick toxin	البشرة أو الجلد	سام للخلايا يؤدي إلى الموت الموضعي للجلد
B. anthracis	سم معقد	مختلف أو غير معروف	مميت
Cl. perfringens	سم محلل لكريات الدم الحمراء (Haemolysin)	كريات الدم الحمراء	تحلل الدم
St. aureus	سموم الفا و بيتا ($\alpha + \beta$)	كريات الدم الحمراء	تحلل الدم
Cl. botulinum	السم البوتيوليني	الأعصاب	شلل العضلات
St. pyogenes	السم البوتيوليني	الليفين (Fibrin)	هضم الليفين
St. pyogenes	Streptokinase ستربتوكاينيز	الليفين (Fibrin)	هضم الليفين

5. دور السم في أحداث المرض

Role of bacterial protein toxins in disease

شرحنا في الفصل الثاني والفصل السادس، دور السم في نشوء المرض
(الامراضية) وعن دوره في المرض فيما يتعلق بعلم أمراض النبات وعلاقة ذلك 8
بتعريف أو توضيح مفهوم السمية، وقد استعرضنا الآراء المختلفة حول ذلك والتي قسمٌ منها يعتمد على التعاريف المتداولة لهذه المصطلحات والقسم الأخر يعتمد على التفسير المنطقي للتعبير عن حالة المرض والأمراضية. ولفهم هذا الموضوع في علم أمراض الإنسان والحيوان لا بد من التطرق إلى بعض المصطلحات المتداولة في هذا الاختصاص والتي قد تساعد بدورها على إزالة الغموض وتقريب فهم دور السم في المرض والامراضية.

هناك مراحل متعاقبة وسلسلة من العلاقات بين الكائن الحي المجهري والمضيف (الإنسان أو الحيوان) لحين التعبير بشكل صريح عن المرض وأعراضه.

ان الأحياء المجهرية التي تنمو وتنتعش في أنسجة المضيف يطلق عليها الطفيليات. وقسم من هذه الطفيليات تكون جزأً من الأحياء المجهرية المتواجدة بصورة طبيعية في المضيف ويطلق عليها بالطفيليات المتعايشة. والقسم الأخر يُظهر له المضيف استجابة معينة تنتج عنها إصابة مرضية. ولا بد من الإشارة إلى ان الموقع الذي يأوي إليه العامل الجرثومي تتم السيطرة عليه بواسطة عوامل خاصة تتعلق بالمضيف وبالكائن الحي المجهري. بعض الأحياء المجهرية تبقى في بيئة أو في محيط خارج الخلايا والقسم الأخر يفضل أو يحتاج إلى ان يكون داخل محيط الخلايا. الأحياء المجهرية التي تقطن أو تقيم في المضيف وتكون

مستعمرات دون ان تظهر أي استجابة مناعية تسمى بالأحياء الجهرية المستعمرة*(Colonizer) .

أما الأحياء الجهرية التي تظهر استجابة مناعية دون ان تسبب أعراضاً واضحة ومعلنة تسمى بالأحياء الجهرية المحدثة للإصابة، والأحياء الجهرية التي تظهر أعراضاً واضحة تعبر فيها عن حالة الإصابة تسمى بالأحياء الجهرية المرضة. ان قابلية الكائن الحي الجهري على إحداث حالة الامراضية (Pathogenicity) يمكن ان يعبر عنها كمياً بعامل الفوعة أو الضراوة (Virulence) والتي تسمى أحيانا بالضراوة أو شدة المرض. وان الفوعة أو الضراوة ترتبط بقابلية الكائن الحي الجهري (الكائن المرض) على غزو أنسجة المضيف أو إفراز وإنتاج السموم (Toxigenicity) أو كليهما معاً (Madigan *et al.*, 2002).

ولتفسير ما تقدم فان هناك عوامل متعددة خاصة بكل من المضيف والكائن الجهري والتي تساعد في فهم العلاقات أو الحالات الغير طبيعية الناتجة من علاقة المضيف بالكائن الجهري والتي قد تساعد على فهم حالة المرض أو مقاومته من قبل المضيف.

ان العوامل التي يمتلكها المضيف والتي تمنع غزو الأحياء الجهرية لأنسجته تشمل حواجز فيزيائية وعوامل فسيولوجية تتركز في نقاط الدخول إلى المضيف، كما في الجهاز التنفسي والجهاز الهضمي. والوسائل الدفاعية للمضيف والتي هي جزء من الطبقة السطحية الطلائية (الظهارية) وتحت الطلائية (تحت الظهارية) تشمل العوامل الكيميائية في أنسجة المضيف، الجهاز اللمفاوي والخلايا الملتهمة

---

* Colonizer : ينشأ مستعمرة ويقيم فيها.

(خلايا البلعمة). وهناك أمور أخرى يتمتع بها المضيف تكون بمثابة عوامل مقاومة له هي العمر، النوع ونوع التغذية. وهناك شواهد تجريبية تشير إلى ان ايون الحديد يلعب دوراً مهماً وفعالاً في عملية حدوث الإصابة والمرض، حيث من الواجب على الكائن المجهري أن يستخلص ايون الحديد من المضيف للبقاء حياً أو لإدامته وبالتالي تتكون مواقع ارتباط بين الكائن المجهري والمضيف يطلق عليها بـ (Siderophores) (Linton,1986).

وقد لوحظ كذلك بان الأحياء المجهرية المتواجدة بصورة طبيعية في المضيف (Host microflora) تؤثر على مواقع الغزو التي تقيم فيها الأحياء المجهرية بهدف إقامة مستعمراتها.

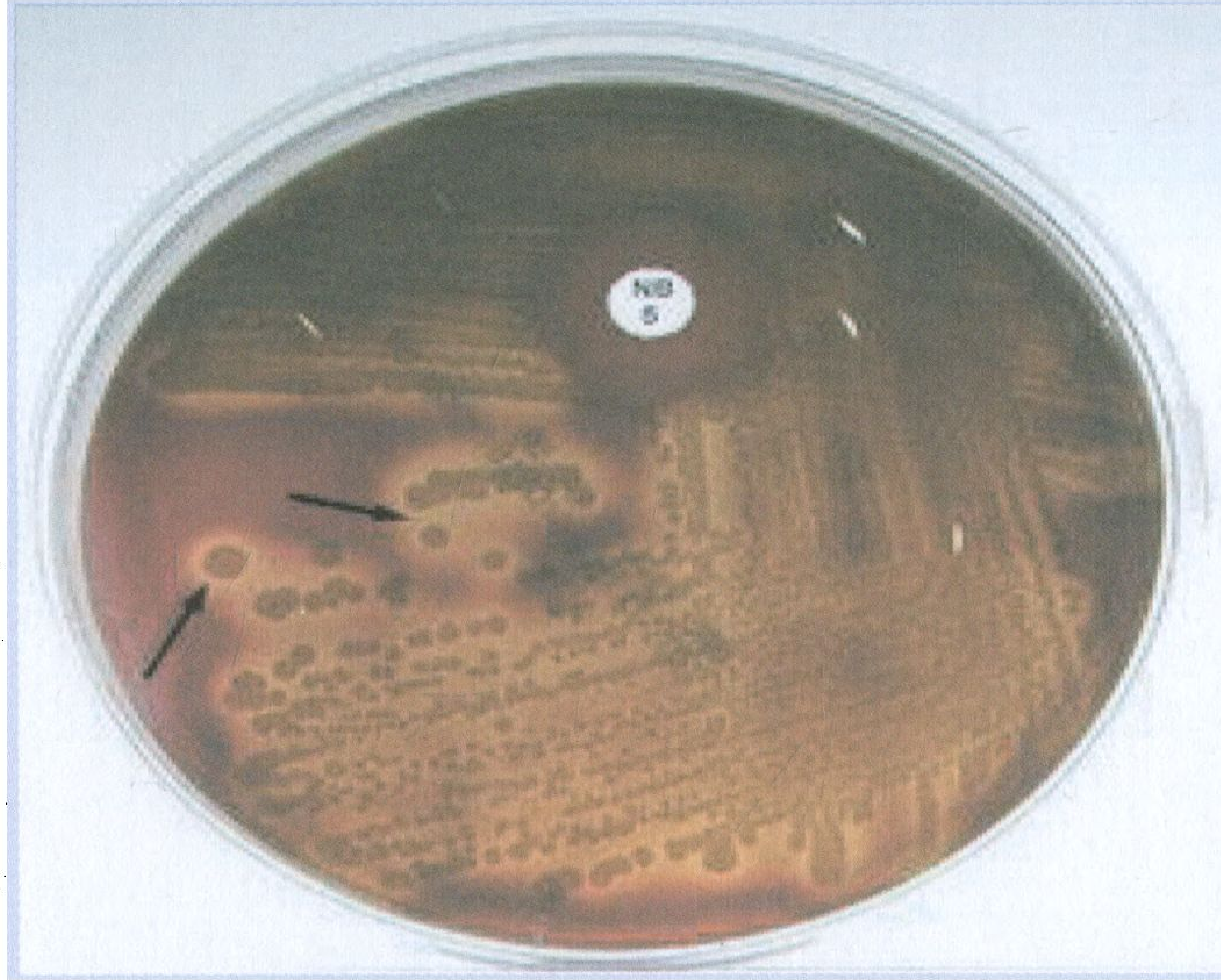
أما العوامل المتعلقة بالكائن الحي المجهري والتي تؤثر على نتيجة العلاقة بينه وبين المضيف فهي قدرة بعض أنواع (الأحياء المجهرية) البكتيريا على تكوين انزيمات معينة تساعد على غزو أنسجة المضيف والقسم الأخر القدرة على تكوين وإفراز السموم. والسموم تكون على نوعين أما سموم خارجية أو سموم داخلية (حسب التسمية السائدة) وبصورة عامة تتكون السموم الخارجية (راجع الفصل التاسع) من وحدتين فرعية أو جزيئية (Two subunits) إحدى هاتين الوحدتين يستخدمها الكائن المجهري للارتباط بأنسجة المضيف والوحدة الأخرى يستخدمها لاختراق الخلية لإحداث فعلها هناك.

أما السموم الداخلية فهي وحدات الدهنيات العديدة التسكر للغشاء الخارجي لبكتيريا السالبة لجرام (راجع الفصل العاشر).

مما تقدم يمكن أن نلخص حالة الامراضية على أنها قدرة الكائن المجهري (البكتيريا) على مقاومة الوسائل الدفاعية للمضيف ولعل من أهم الوسائل

الدفاعية للمضيف هو عمل الخلايا الملتهمة للقيام بعملية الالتهام أو البلعمة (Phagocytosis) حيث تقاوم البكتيريا بهذه العملية من خلال وجود، مركبات سطحية مختلفة مثل الكابسول وبعض المركبات البروتينية على سطح الخلية. ولعل من ابرز العوامل التي تمكن الكائن الممرض من التعبير عن نشاطه هو قابلية التصاقه بالمضيف (أنسجة المضيف) من خلال ما يمتلكه من شعيرات (Pili) وبالتالي يكون دائم الالتصاق بمضيفه وقادراً على إنتاج وتحرير العوامل (السموم والانزيمات) المرتبطة بالتعبير عن حالة المرض كمياً

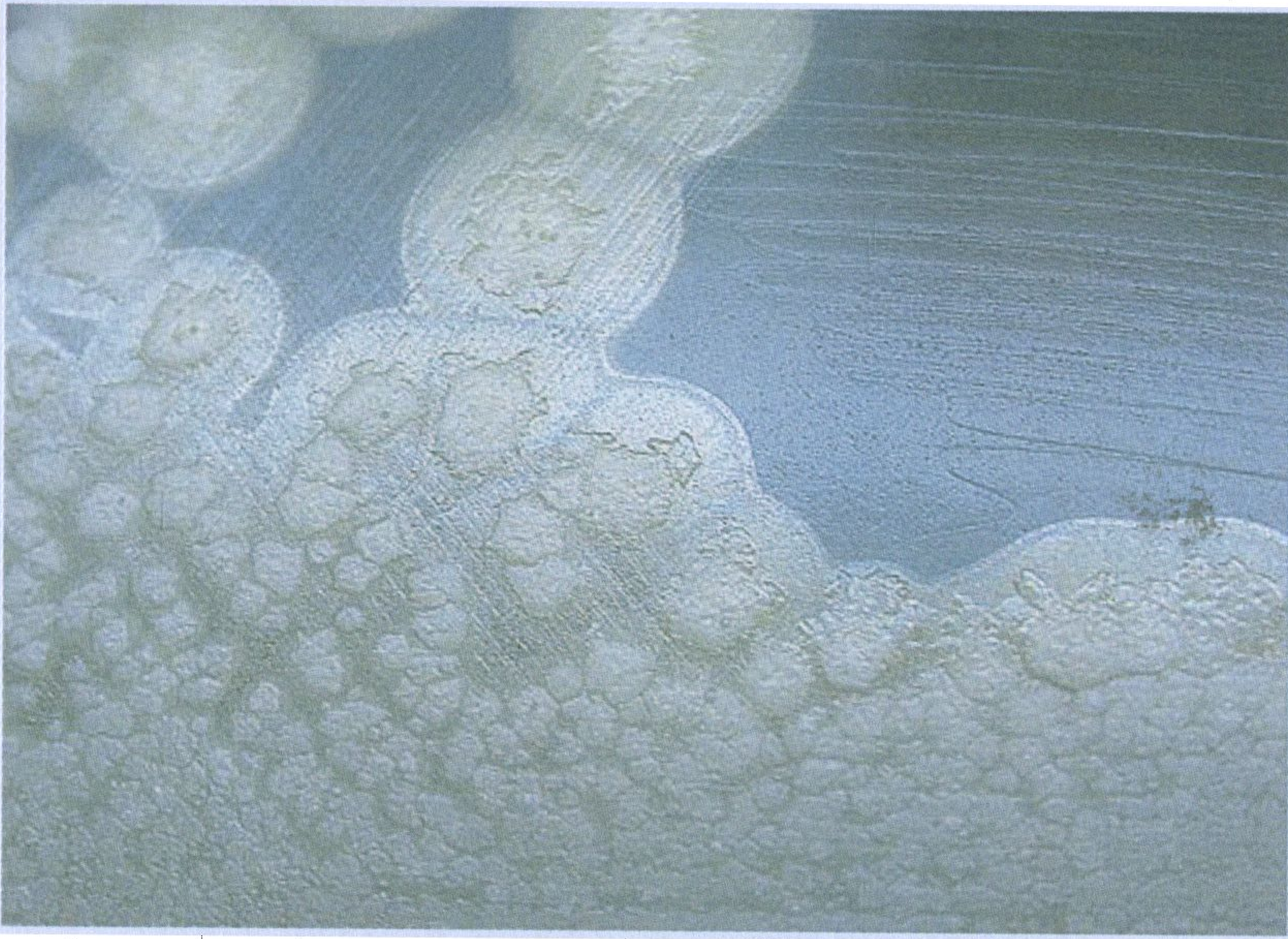
(Madigan *et al.*,2000; Forbes *et al.* 2002; Greenwood *etal.*,2007)



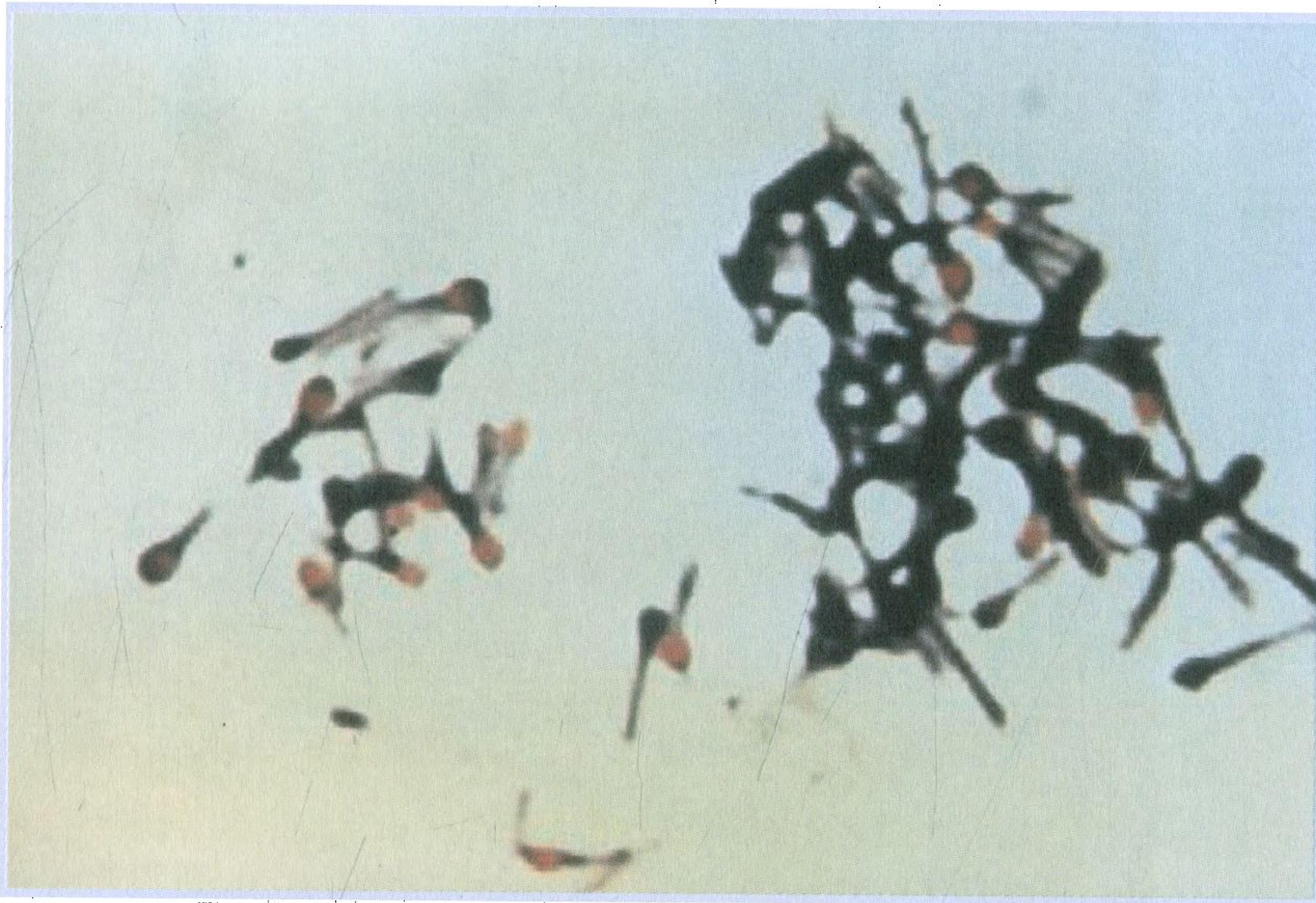
شكل (1) نمو البكتيريا العنقودية Staphylococcus aureus
على اكار الدم لاحظ مناطق التحلل التام حول المستعمرات
master.encyclopedia www.national



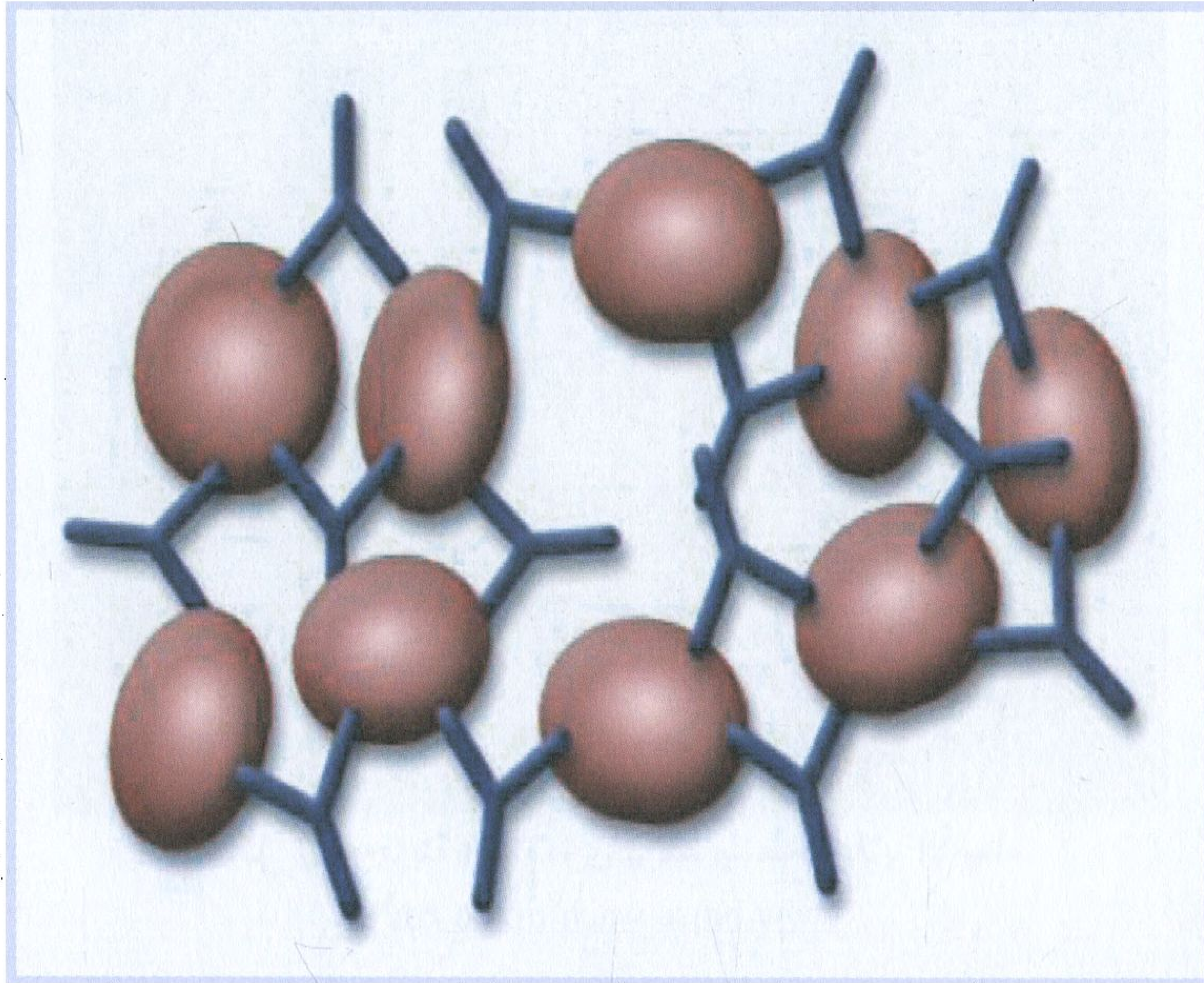
شكل (2) ورم قيحى ناتج عن البكتيريا العنقودية
www.revolutionHealth.com



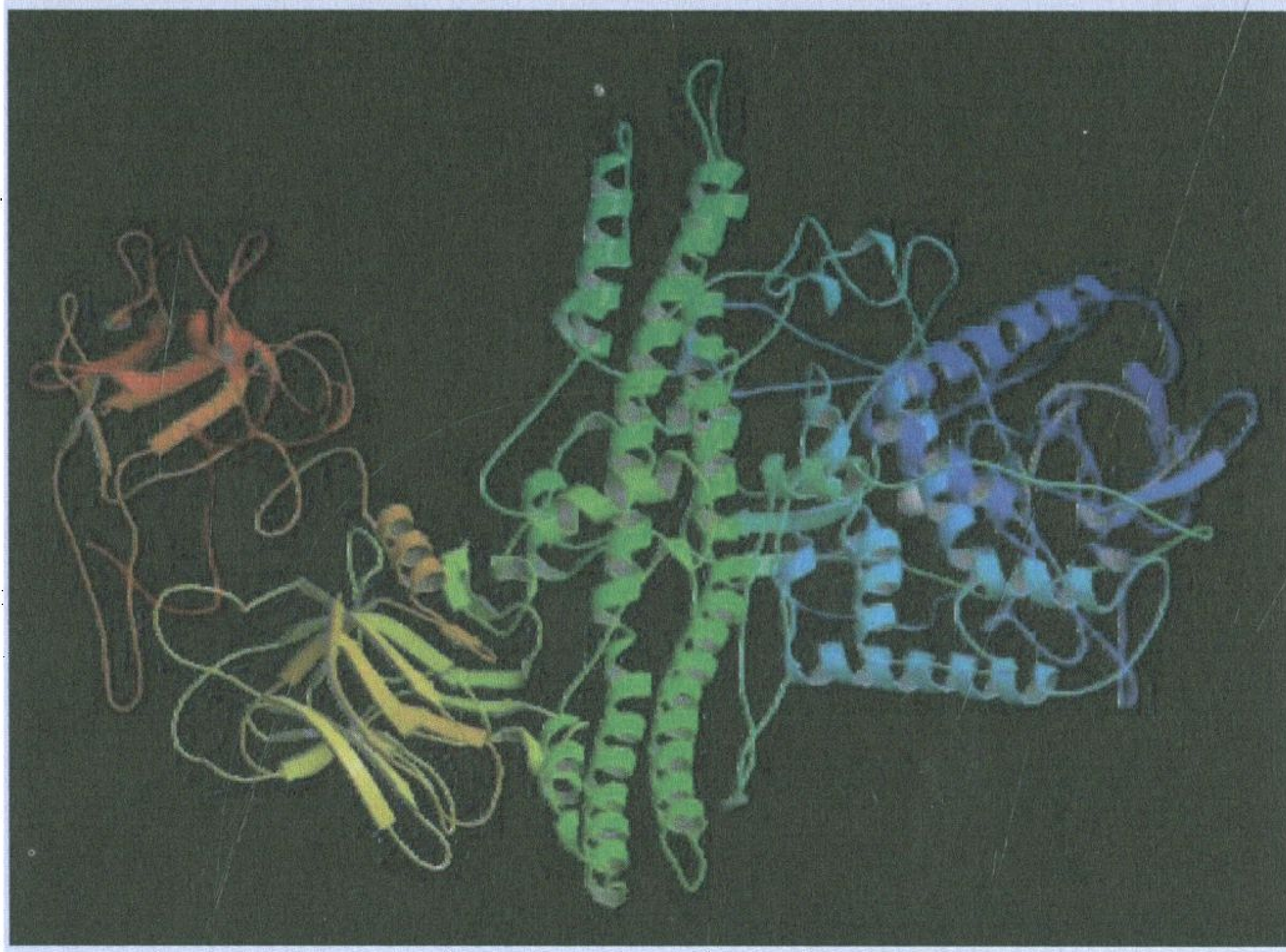
شكل (3) مستعمرات بكتيريا السم البوتيوليني كما تظهر على سطح الوسط الزرعى الخاص بها
http:/farm4.static .flickr.com



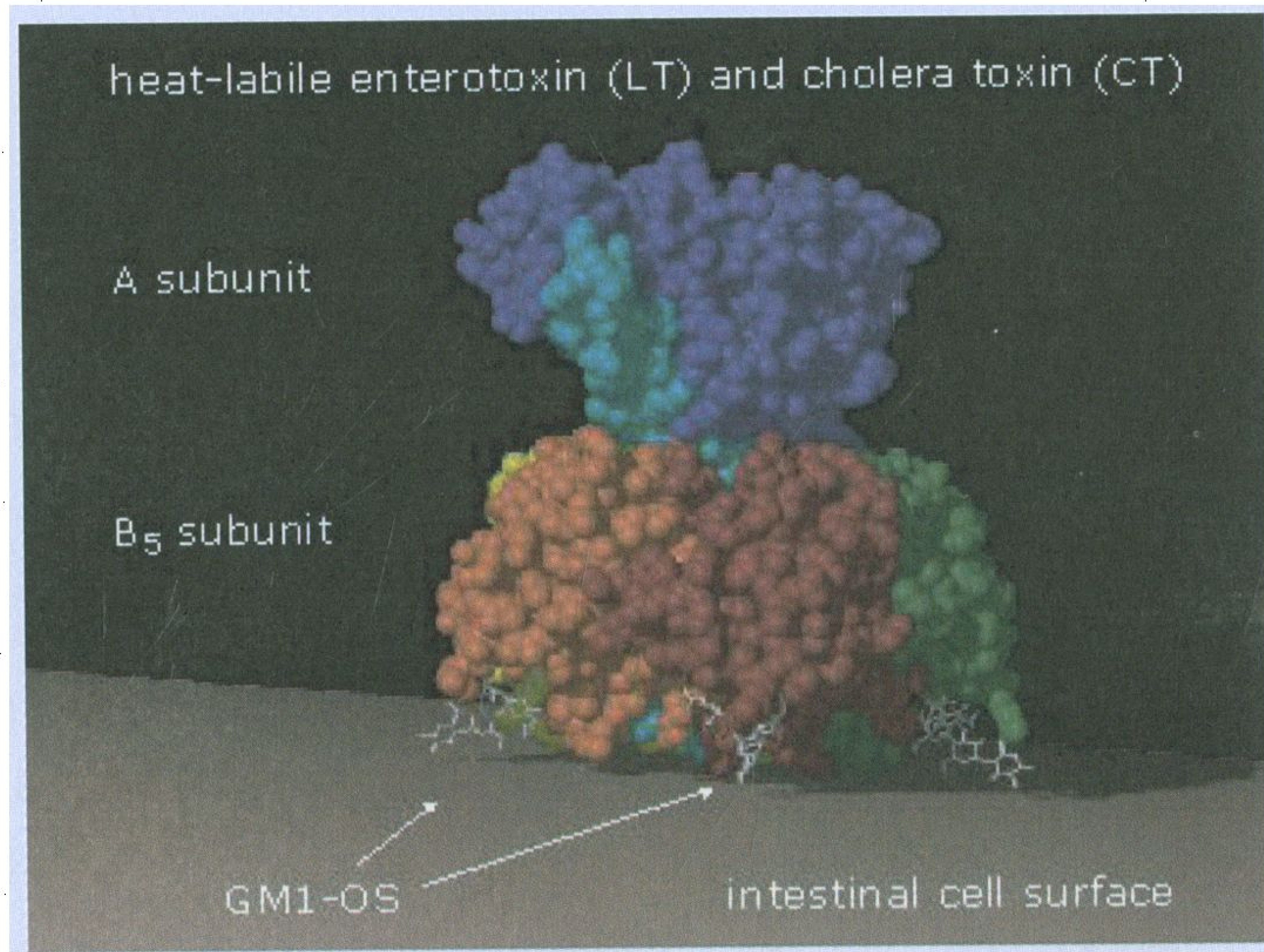
شكل (4) عصيات بكتيريا الكزاز فى نسيج حى
Up load .wikimedia.org/wikipedia



شكل (5) جزيئات السم البروتينى ومواقع المحددات الانتيجينية لها المرتبطة بالأجسام المضادة
e.comwww.natur

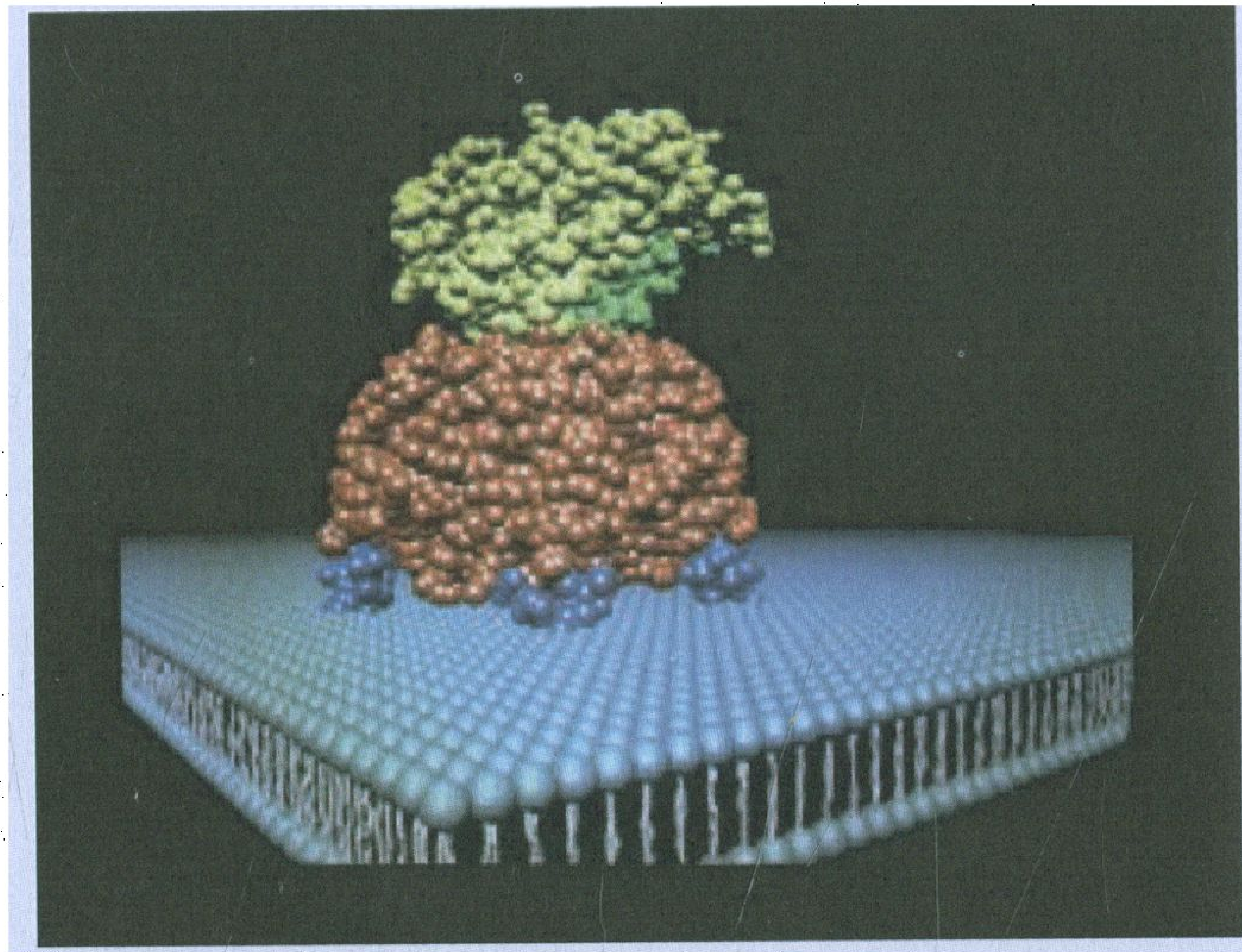


شكل (6) المظهرى لسم يؤثر على الجهاز العصبي
www. Chemistry .about.com



شكل (7) جزيئة سم معوى ترتبط بسطح خلايا الأمعاء

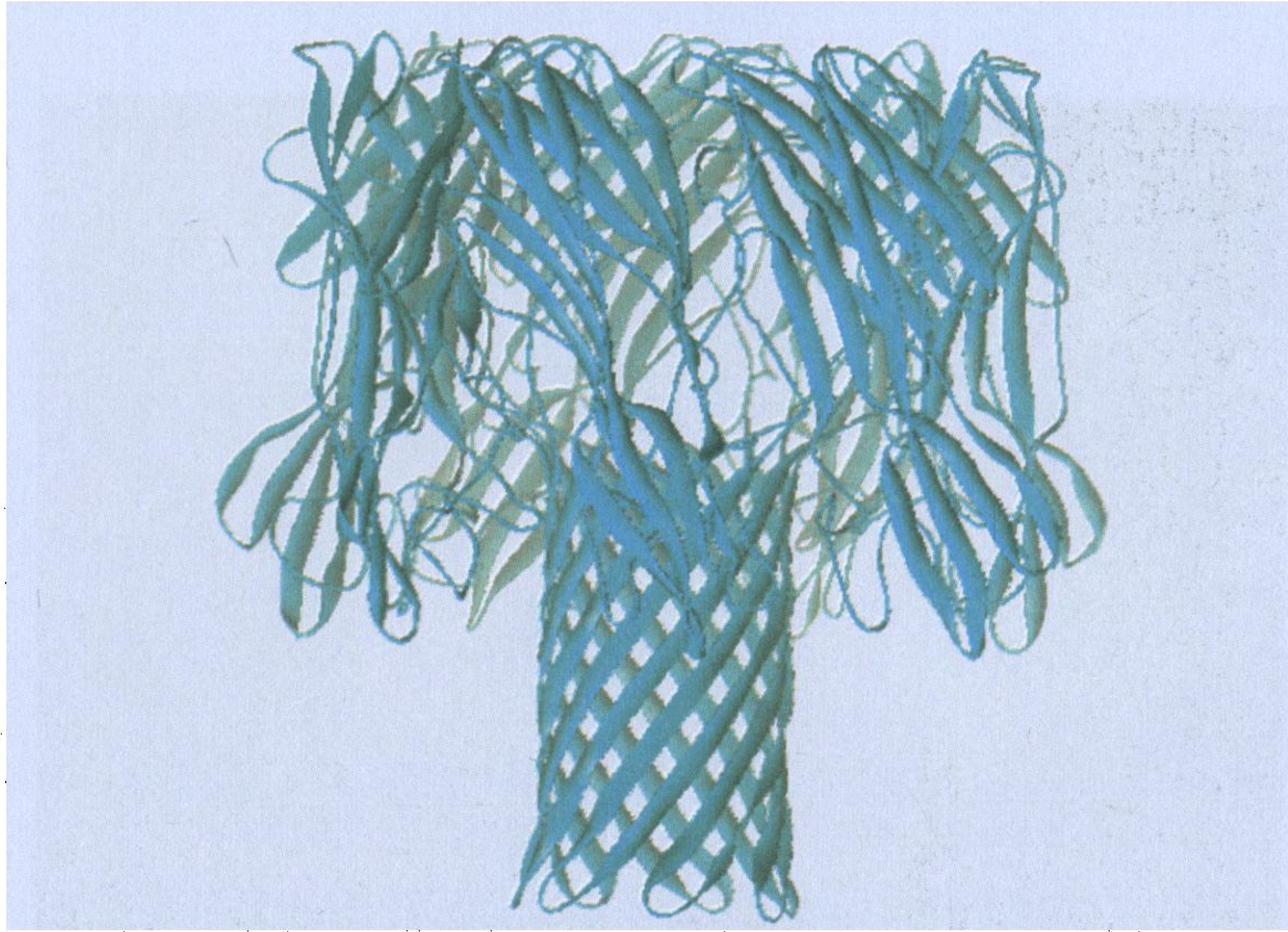
www.bmsc.wachington.edu



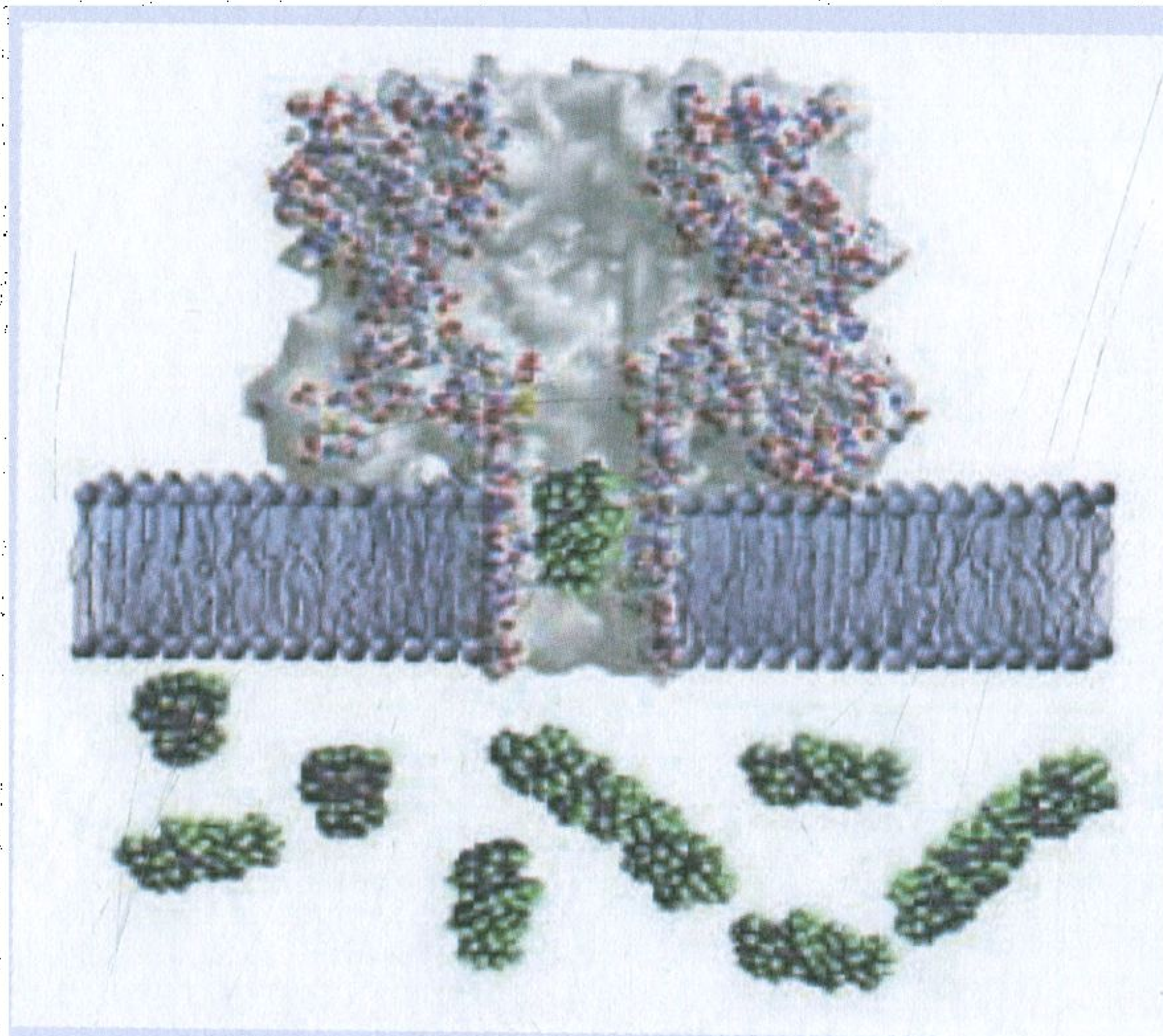
The structure of the cholera enterotoxin, shown in a false-colour image obtained by X-ray protein crystallography.

شكل (8) السم المعوى لبكتيريا الكوليرا

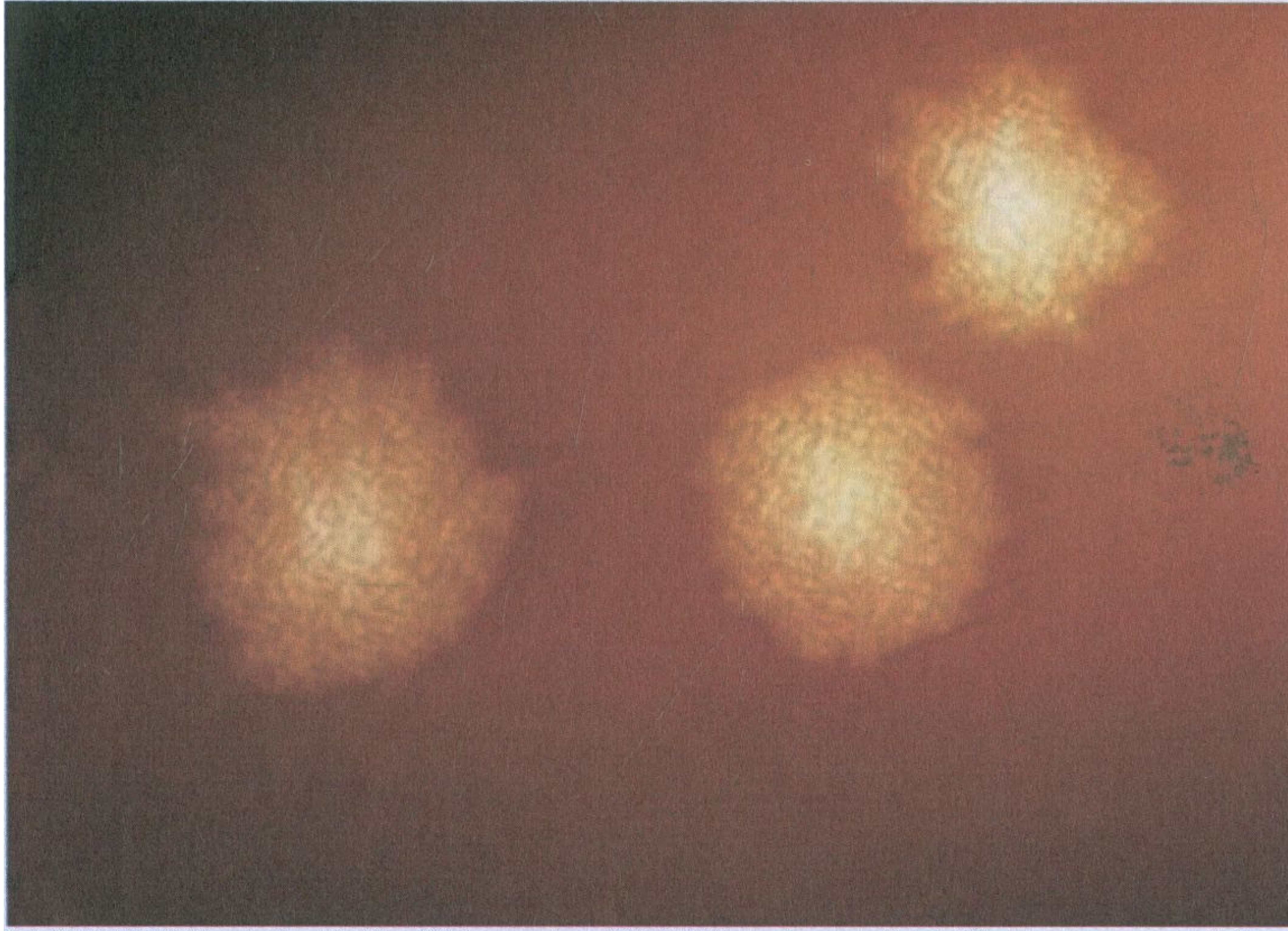
www.britannica online ...



شكل (9) التركيب المظهرى لسم محلل للدم نوع الفا
alph hemolysin
www.tulane.edu



شكل (10) السم المحلل لكريات الدم الحمراء hemolysin لاحظ تحليلة للغشاء الخلوى
www.eurekalert.org/multimedia/pub



شكل (11) سم cytotoxin المنتج من احد أنواع جنس الكلوستريديا
www.upload.wikimedia



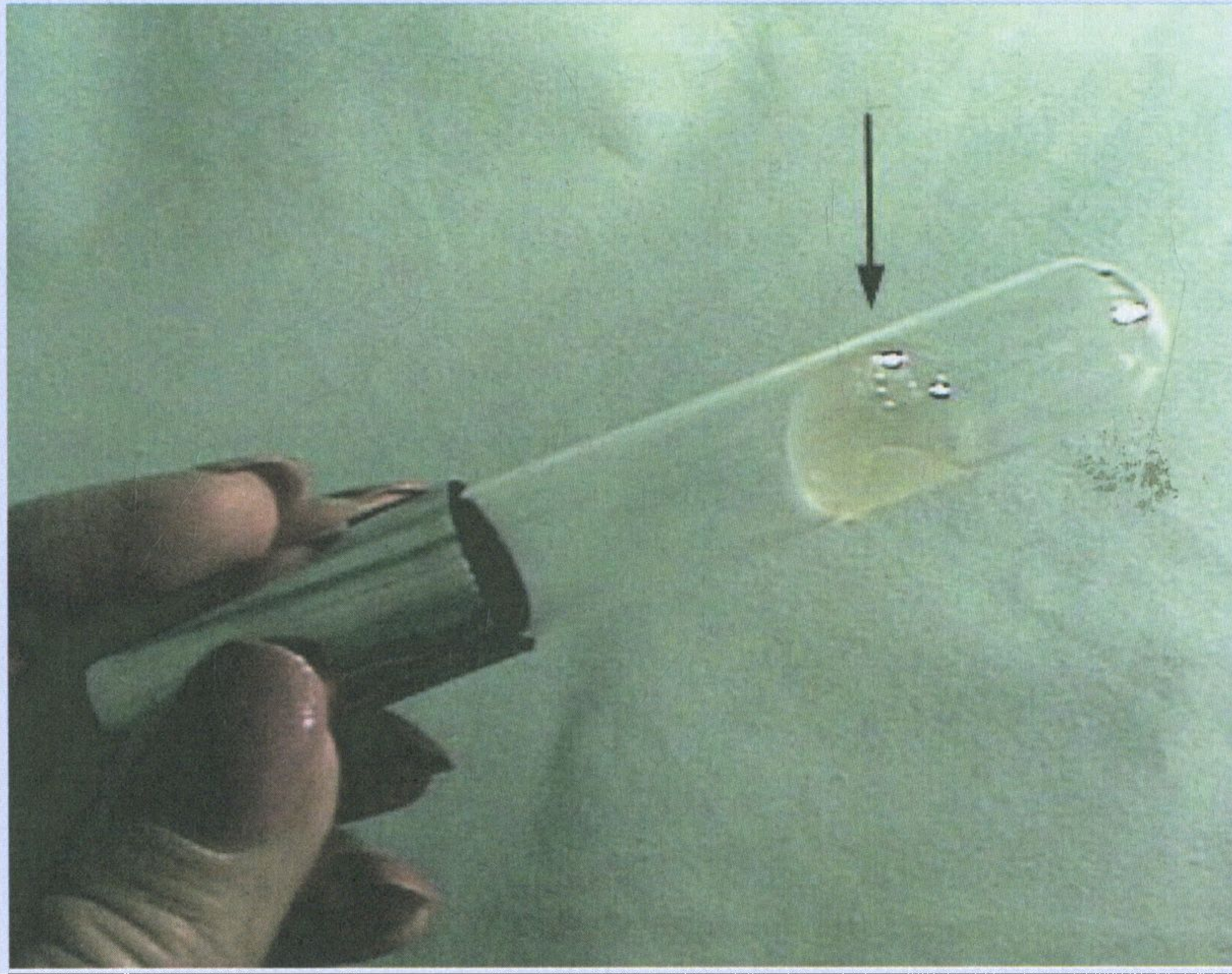
شكل (12) السموم ذات الفعل والطبيعة الانزيمية phospholipase
www.ks.uiuc.edu



شكل (13) Phospholipase enzyme
http:/upload.eikimedia



شكل (14) فحص انزيم coagulase الموجب كما يظهر على سطح اكار الدم
Randstarteam.blogspot.com



شكل (15) فحص تخثر مصل الدم الموجب بواسطة انزيم coagulase

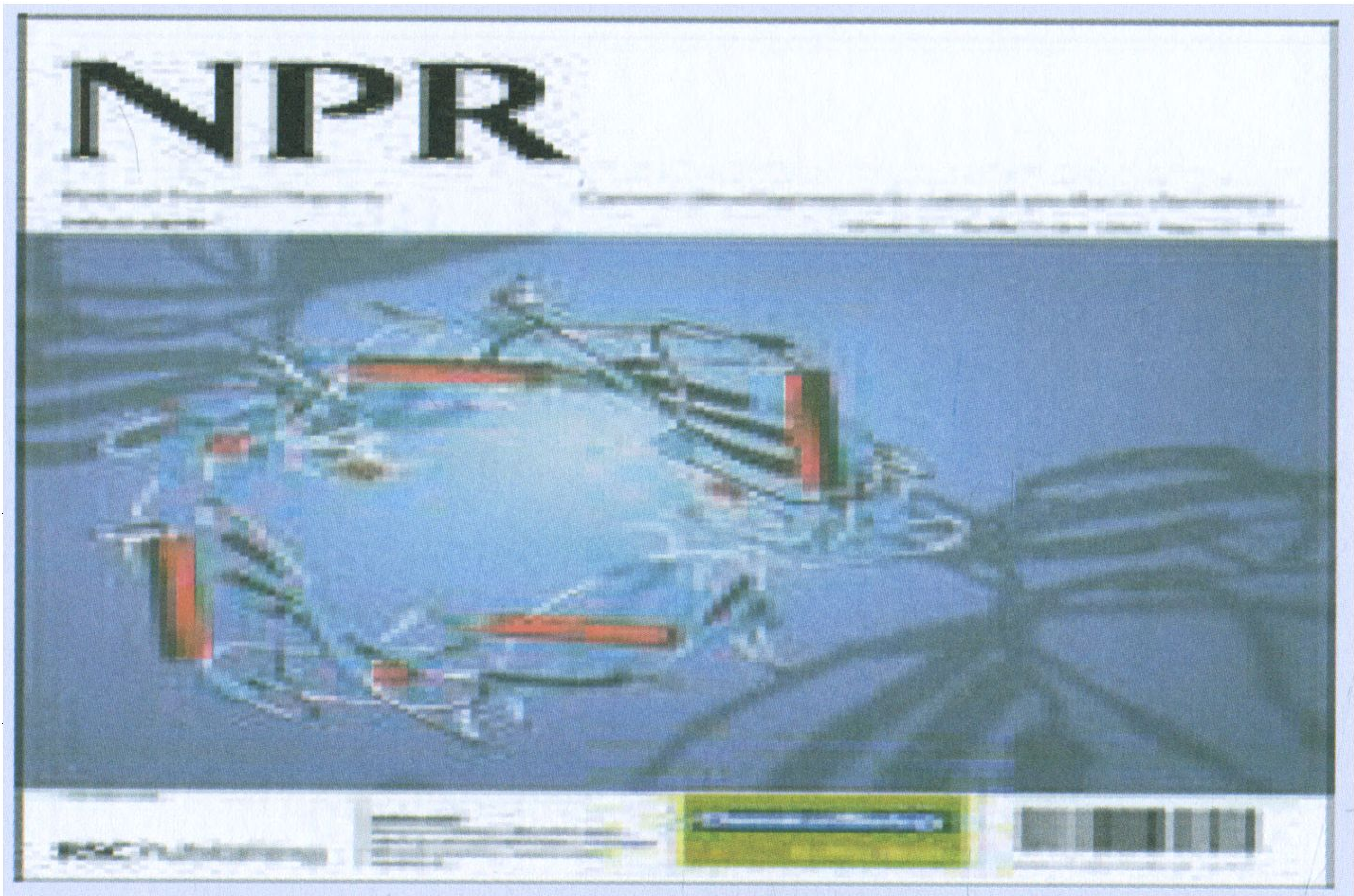
www.mc.maricopa.edu



شكل (16) الشكل العام للـ Streptokinase بواسطة الشريط المزركش

http:/tumj.tums.ac.ir/ar…

8



شكل (17) تركيب streptokinase

www.rcs.org./ejga/np/2006

الفصل التاسع 9

تصنيف السموم البكتيرية البروتينية (السموم الخارجية) على أساس تركيبها وآلية فعلها

Classification Of Bacterial Protein Toxins According To Their Structure And Or Mode Of Action

1. مقدمة

Introduction

لقد تم تشخيص نوعين من النواتج البكتيرية السامة والتي يطلق عليها بالسموم الداخلية والسموم الخارجية. حيث تعتبر السموم الداخلية جزءاً من التركيب الخلوي والتي تحرر من الخلايا الميتة أو المتحللة لبكتيريا السالبة لجرام. اما السموم الخارجية فهي النواتج السمية الذائبة للخلايا الحية وعلى الاكثر تكون من بكتيريا الموجبة لجرام ، علماً بان هذا التصنيف قد اعتمد على الاكتشاف التاريخي لهذه المواد السامة. ومع تطور العلوم المختلفة ووسائل التقنيات الحديثة سواءً في التشخيص أو التركيب الكيميائي أو دراسة فعل هذه المواد السامة اصبحت هذه المفاهيم هي مفاهيم تقريبية ومتقاربة من بعضها البعض. فعلى سبيل المثال هناك العديد من المواد السامة التي يطلق عليها بالسموم الخارجية ووجد انها تتراكم داخل الخلية ويمكن استخلاصها من الخلايا

في حين وجد بان المواد التي يطلق عليها بالسموم الداخلية ممكن ان تتحرر من الخلايا الحية السليمة وعليه فإن فكرة أو مفهوم السم الخارجي أو السم الداخلي من الناحية الجوهرية تنطوي تحت مفاهيم غامضة أو ملتبسة.

ولاجل التغلب على هذه الصعوبات أو الملابسات فإن تبني فكرة التصنيف على اساس التركيب الكيميائي أو آلية فعل السم هو الافضل والاقرب للواقع العملي والعلمي ونظراً لكون التركيب الكيميائي لم يحسم بشكله النهائي للعديد من السموم أو خاضعاً لنظرية تخليق أو بناء السم كيميائياً لاثبات تركيبه الطبيعي سيما وان هناك العديد من الصعوبات خصوصاً بالنسبة للسموم ذات الاوزان الجزيئية العالية جداً. وبناءاً على هذا ففي حالة عدم التمكن من الاعتماد على التركيب الكيميائي سيتم التصنيف على اساس آلية فعل السم وهو الاختيار الافضل في الوقت الحاضر (Linton, 1986 ; Forbes et al., 2002; Timbury et al.,2002; Greenwood et al., 2007; Todar, 2008) .

2. سموم الوحدات الفرعية أو الجزيئية

The sub unit toxins

أ- سم الخناق Diphtheria toxin

تسبب بكتيريا *Corynebactrium diphtheriae** مرض الخناق والتي يمكن عزلها اعتيادياً من موقع الاصابة الاولي المتمثل بالغشاء المحيط بالحنجرة أو الحلقوم، الا ان نتائج التشريح بعد الوفاة عكست انتشاراً واسع الاضرار في مختلف اعضاء الجسم متمثلة بالموت الموضعي للانسجة والنزف الدموي. ان هذه الاضرار قد وصفت لاول مرة عام 1888م من قبل العالم **Roux** والعالم

* Diphtheria : غشاء

Yersin بانها ناتجة عن سم خارجي نشط جداً، غير ثابت بالحرارة تفرزه البكتيريا في منطقة البلعوم الانفي (**Nasopharynx**)، وينتقل الى انحاء الجسم بواسطة المجرى الدموي. كما تمت الاشارة في عام 1890م الى ان الاضداد (الاجسام المضادة) التي تتكون ضد هذا السم لها القدرة على حماية المضيف من المرض نفسه، كما ان معاملة سم الدفتريا بالفورمالين المخفف يجعله غير سام دون ان يضعف من فعالية المناعية والسيرولوجية مما ادى الى استخدام نظام تمنيع واسع خصوصاً عند الاطفال لحمايتهم من الاصابة بالمرض.

ان للسم نشاط واسع ضد عدد من الحيوانات، كالأنسان، الارانب، خنازير غينايا وبعض الطيور وان الجرعة القاتلة من السم تكون بحدود 50-100 نانوكرام (**ng**) لكل كيلوغرام من وزن الجسم.

تركيب السم : في نهاية السبعينات من القرن الماضي اوضح **Collier** وجماعته بان تحضيرات من سم الدفتريا تحتوي على مادة بروتينية ذات وزن جزيئي واطئ وانها اكثر نشاط من الجزيئة الكلية للسم الخام في منع عملية بناء البروتين في الخلايا الحرة. اوضحت الدراسات اللاحقة بان السم ككل هو عبارة عن مقدمة أو جزء امامي يقوم بنشاط انزيمي هو **ADP-ribosylation** يستقر في الجزء غير السام المحلل للبروتين والذي يكون ذا وزن جزيئي بحدود 22000 دالتون . ان سم الدفتريا ذو وزن جزيئي يتراوح بين 62000-63000 دالتون وهو عبارة عن وحدة مفردة من متعدد الببتيدات تحتوي على اصرة ثنائية الكبريت شكل (9-1).

ان المنطقة بين الاصرة الثنائية الكبريت والتي تكون قريبة من جزء الامين (NH_2) النهائي أو الطرفي للبروتين والتي تحتوي على ثلاثة جزيئات من الحامض الاميني الارجنين (**Arginine**) تكون معرضة جداً للفلق بواسطة انزيم التربسين (**Trypsin**) الهاضم للبروتين ان هذا الفلق أو الكسر يعطي جزئين من متعدد

الببتيدات والتي تكون محمولة سوية بواسطة اصرة ثنائية الكبريت مفردة. ان معاملة السم المكسور (المفلوق) بمواد الثايول (Thiol) مثل المركبتوايثانول أو الداي ثايوثيريتول يعطي جزئين من وحدة متعدد الببتيدات يطلق عليها بالجزء A والجزء B (شكل9-1).

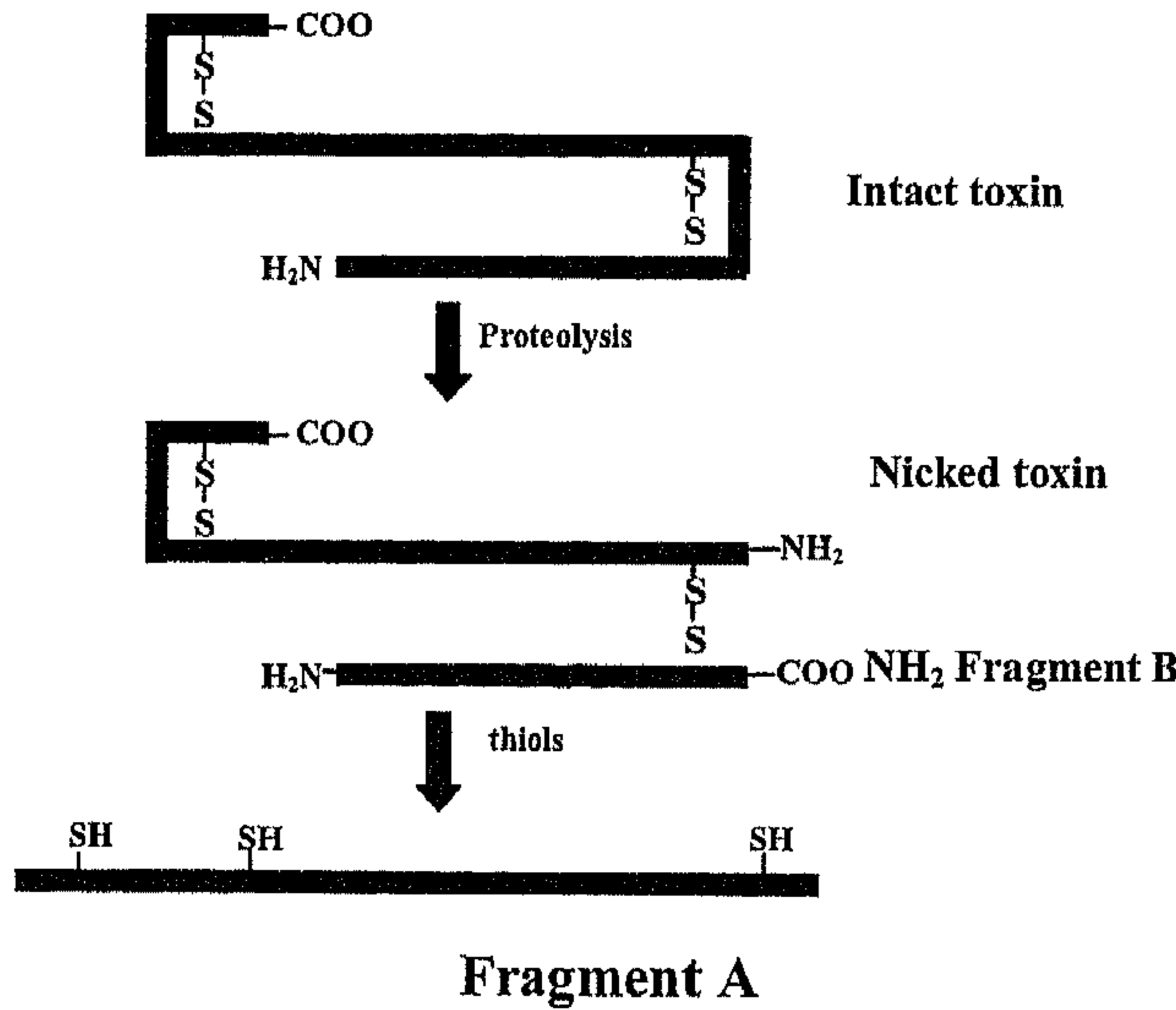
الجزء A يكون ذات وزن جزيئي 22000 دالتون تقريباً، ثابت بالحرارة، يقاوم الغليان لفترة قصيرة وكذلك عند تعرضه الى درجات حموضة متطرفة دون ان يفقد نشاطه البايولوجي. يحمل هذا الجزء كل الأنشطة الانزيمية (-ADP ribosylation) للسم وهو مثبط نشط لعملية بناء البروتين في الخلايا الحقيقية الحرة، وعلى اية حال فإن الجزء A له نشاط سمي بمقدار 0.01٪ من الانشطة السمية لجزيئة السم الكاملة أو السليمة وهذا يشير الى ان الجزء المتبقي من جزيئة السم له دور نشط في نقل الجزء A من الوسط المحيط الى داخل سايتوبلازم الخلايا لكي يظهر نشاطه السمي.

كما ان الاضداد (الاجسام المضاد) التي تحضر ضد الجزء A لاتعادل جزيئة السم الكاملة وهذا يشير الى ان الموقع المستضدي (الانتيجين) على الجزء A يُحجَب أو يتستر بموقع الجزء B على جزيئة السم الكاملة. اما الجزء B فهو ذو وزن جزيئي يتراوح بحدود 40000 دالتون ويقوم بعملية كبح أو منع بناء البروتين في الخلايا الكاملة أو خلاصة الخلايا الحرة. ان هذا الجزء عكس الجزء A يكون غير ثابت أو مستقر في المحاليل المائية الاعتيادية وحديثاً تمت الاشارة الى امكانية اذابة هذا الجزء في المحاليل الحاوية على مواد مثل اليوريا و (SDS) وهي عوامل مفككة قوية. ان المعلومات المتوفرة عن تركيب وخواص الجزء B محدودة نسبة الى المعلومات المتوفرة من دراسة السم الناقص الذي يحتوي على الجزء B النشط والذي يفقد الجزء A . ان الخلايا المعرضة للاصابة أو الحساسة

للسم لابد وان تحتوي على جزء مستقبل أو متقبل نوعي متخصص (Receptor) والذي ترتبط به جزيئة السم عبر الجزء **B** منها.

ان دراسة كيفية ارتباط السم بالخلايا المعرضة للاصابة يعكس وجود حوالي 4000 موقع أو جزء مستقبل نوعي مع جدار الخلايا (نوع **Hela**)، وان سبب مقاومة الفئران والجرذان للاصابة عند تعرضها للسم هو فقدانها لمثل هذه المواقع المستقبلة النوعية. علماً بان الجزء المستقبل النوعي غير معروف لحد الان.

ولقد اشارت الدراسات الى ان الخلايا المعرضة للاصابة بالسم تحتوي على جزء بروتيني ذي وزن جزيئي بين 120000 - 170000 دالتون والذي يكون غير موجود على سطح الخلايا غيرا لمعرضة للاصابة أو المقاومة للاصابة بالسم.

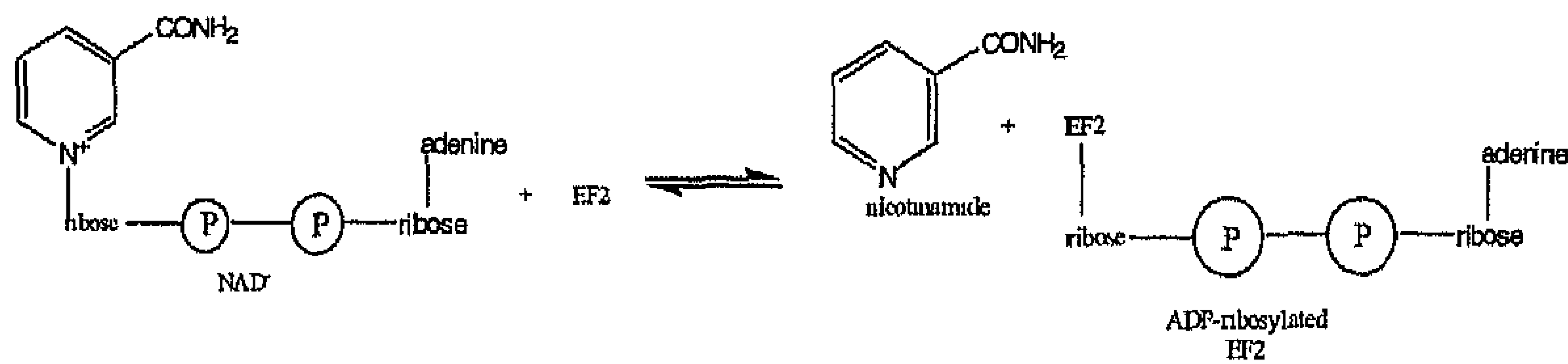


Fragment A

شكل 9-1: تركيب سم الخناق يتكون السم من وحدة متعدد الببتيد مفردة تفلق بواسطة الانزيمات المحللة للبروتين الى جزئين تُعرف بـ A و B تحمل معاً بواسطة اصرة مختزلة ثنائية الكبريت .
(Stephen & pietrowski, 1991)

عند دراسة الية نشاط سم الدفتريا اشارت الدراسات الاولى في هـذا المجـال الى ان السم يسبب ضرراً أو تلفاً في الانسجة البعيـدة عـن موقـع انتاجـه الاولى ومن الانسجة المعرضة للتلف هي نسيج البنكرياس، الا ان الضرر الاكبر يظهـر على الانسجة القلبية. وتـشير الدراسـات الالكترونيـة الى ان التـأثير الاولـي أو الضرر الاولي يظهر في الـشبكة الـساركوبلازمية (Sarcoplasmic reticulum) للالياف العضلية.

الدراسات الحديثة تشير الى ان نشاط السم الاولي علـى عمليـة بنـاء أو تخليـق البروتين ولا بد من استخدام خلايا حيوانية حساسة للسم والتي تظهر نفـس قابليـة التعرض التي يبديها الحيوان المشتقة منه. حيث لاحظ عدد من الباحثين، منع عمليـة بناء البروتين عند تعرض خلايا Hela الى سم الدفتريا بعـد فـترة حـضانة سـاعة الى ساعة ونصف وقسم اخر من العلماء اظهر بان عملية بناء البروتين في الخلايا الحـرة يعتمـد علـى وجـود مـادة (NAD^+) الـضرورية لتثبـيط (Inactivation) الـبروتين الاساسي في عملية بنـاء الـبروتين في الخلايـا الحقيقيـة والـذي يطلـق عليـه بعامـل التطويل أو العامل المطول Elongation factor (EF2).



شكل 9-2 : ميكانيكية تثبيط العامل المُطَول (Ef2) بواسطة سم الخناق

كما اظهرت الدراسات باستخدام العوامل المشعة عند حقن سم الخناق مع عامل EF_2 بوجود NAD^+ ان السم يمنع عملية بناء البروتين وذلك بتحفيز نقـل شطر ADP-ribose من NAD^+ الى موقع حامض اميني في عامل EF_2 حيث يتم تحميل الاخير. ان جزيئة واحدة من السم لها القابلية على التفاعل مع عـدد مـن

جزيئات العامل (EF_2) داخل الخلية وبالتالي قتل الخلايا المعرضة للاصابة بالسم بعد مرور 24 ساعة

(Linton,1986; Madigan et al., 2000; Timbury et al.,2002)

من الجدير ذكره هنا بان انتاج السم من خلايا الـ Corynebacterium diphtheriae لايتم الا في الخلايا المصابة بالفيروس المحلل للبكتيريا (Lysogenic bacteriophage) والتي تحمل في جينومها (Genome) الجين المسؤول عن توليد السم (Linton,1986; Greenwood et al.,2007). 9

ان السلالات غير السامة من بكتيريا الخناق ممكن ان تحول الى سلالات سامة بواسطة اصابتها بالفيروس (Corynephages) الذي يحمل الجين (Toxgene) المسؤول عن توليد السم. كذلك الانواع المقابلة الاخرى لبكتيريا الخناق مثل C. ovis ممكن ان تحول الى بكتيريا سامة بنفس الاسلوب. اضافة الى هذا فإن الفيروس الحامل للجين المولد للسم يقوم ببناء سم مطفر فاقد أو يمتلك لسميه ضعيفة والذي يتفاعل سيرولوجياً مع مضاد السم (Antitoxin) ويسمى بالتفاعل التصالبي (Cross reaction) (Boyd,2005).

ب – سم بكتيريا Pseudomonas aeruginosa .

تتواجد بكتيريا Pseudomonas aeruginosa بصورة طبيعية في التربة، المياه واحياناً تعزل من خروج الاشخاص الاصحاء. وتكون هذه البكتيريا عديمة الضرر للاشخاص الاصحاء البالغين الا ان قابليتها على التكاثر في البيئات الرطبة ومقاومتها لمدى واسع من المضادات الحيوية يجعلها ان تكون المسبب الرئيسي لحالات اصابات التلوث في المستشفيات خصوصاً وبالذات بالنسبة ذوي القدرات والوسائل الدفاعية المضعفة كما في حالات الأمراض المزمنة

وحالات العوز المناعي الوراثي، الاشخاص الذين يتعاطون علاجاً كابحاً للمناعة (Immuno suppressive) وكذلك في الاشخاص الذين يعانون من حروق بالغة.

تسبب بكتيريا Ps. aeruginosa اصابات موقعية في الجهاز البولي، الجهاز التنفسي وفي اصابات الحروق والجروح وبذلك تسبب اضعافاً شديداً للمصابين بها تتطور هذه الاصابات الموقعية الى تسمم دموي عام تنتج عنه حالات وفاة 100٪. ان تفسير آلية أو ميكانيكية الامراض الناتجة عن هذه البكتيريا معقدة جداً وغير واضحة وذلك بسبب ما تحرره أو تنتجه من عدة نواتج من المواد السامة الخارجية النشطة جداً ذات الطبيعة الانزيمية مثل الانزيمات المحللة للدهنيات المفسفرة (Phospholipase) ، انزيم الكولاجنيز (Collagenase) ، الانزيم المحلل للدهنيات (Lipase) ، الانزيم المحل لكريات الدم الحمراء (Haemolysin) والسم المعوي (Enterotoxin) اضافة الى السموم الداخلية (الدهنيات العديدة التسكر). على اية حال فهناك شواهد كثيرة تشير الى وجود سم بروتيني مشابه لسم الخناق والذي ربما يكون عاملاً هاماً جداً لتحديد ضراوة أو فوعة هذه البكتريا. ان هذا السم البروتيني يعتبر اهم ناتج سام لبكتيريا Ps. aeruginosa وان حوالي 90٪ من العزلات المرضية السريرية الهامة تكون هذا الناتج. ان هذا السم يتكون خلال الاصابة بالجرثومة وتتكون ضده الاضداد النوعية (الاجسام المضادة النوعية) في الاشخاص الناجين من الاصابة. في بعض الاحيان نجد ان مضادات السموم (Antitoxin) تقي الحيوانات من هذه الاصابة. لقد تمت الاشارة في عدد من التقارير الى ان العزلات أو السلالات التي لا تحتوي على هذا السم تكون اقل ضراوة من الاخرى الحاوية لهُ.

في عام 1969م تم عزل السم من قبل الباحث Liu وهو غير ثابت بالحرارة واطلق عليه بالسم الخارجي (A). عُزل هذا السم من راشح مزروع بكتيريا الـ Ps. aeruginosa . وعند حقنه في الفئران يولد اعراضاً مرضية مشابه تماماً لما تسببه

الخلايا الحية من البكتيريا. واشارت الدراسات اللاحقة الى ان الامصال المضادة المحضرة ضد السم الخارجي (A) في بعض الحالات تقي الحيوانات كالفئران والكلاب من التأثير المميت للخلايا الحية للبكتيريا. في عام 1975م اكتشف Iglewski و Kabat ان السم الخارجي (A) يشابه سم بكتيريا الخناق في عدة 9
نواحٍ، حيث يمنع عملية بناء البروتين بواسطة ADP-ribosylation للـ EF_2 كما هي الحالة تماماً في آلية نشاط سم الخناق (Collier, 1990; Wick&Iglewski,1990)

أن عملية انتاج السم تعتمد على وجود ايون الحديد في الوسط. ان الوزن الجزيئي لهذا السم يتراوح بين 65000 – 70000 دالتون ويمكن ان ينشط هذا السم بواسطة الانزيمات المحللة للبروتين (أي في راشح المزرعة الخالية من الخلايا). ان كل نشاط السمية لهذا السم تقع على الجزء الناتج من عملية التحلل البروتيني، وهذا الجزء ذو وزن جزيئي يتراوح بحدود 26000 دالتون وبالرغم من حَسم كون السم يتكون من جزئين A و B كما في سم الخناق، لم ينته بعد، الا ان المعروف لنا ان جزء متعدد الببتيدات هو المكون للجزء النشط وظيفياً. توجد اختلافات عديدة ومهمة بين السم الخارجي A وسم الخناق حيث ان السُمين يختلفان من حيث التركيب المستضدي ولا يوجد بينهما أي تفاعل تصالبي سيرولوجي. وكذلك يختلف السم الخارجي (A) عن الجزء A من سم الخناق حيث يكون الاول غير ثابت بالحرارة كما ان لكل واحد منهم مستقبل مختلفاً على جدار الخلية. ولا بد من الاشارة ايضاً الى ان المعلومات المتوفرة عن موقع الجين المولد للسم (Toxgene) تكاد ان تكون معدومة.

كما يوجد هناك ناتج سمي خارجي اخر اطلق عليه بالانزيم الخارجي (S) تفرزه العزلات أو السلالات المرضية من بكتيريا Ps. aeruginosa يمتلك نشاط ADP-ribosylation ليس ضد عامل EF_2 بل ضد بروتين كريات الدم الحمراء ويختلف مناعياً من حيث تركيب المستضد عن السم الخارجي A وهو غير ثابت

بالحرارة نسبياً. كما ان دور هذا السم في عملية الاصابة غير معروف (Stephen & Pietrowski ,1991 ; Greenwood et al.,,2007).

جـ- سم الكوليرا Cholera toxin

الكوليرا مرض الاسهال الحاد وكان المرض مستوطناً في الهند الا انه قد انتشر الى اجزاء اخرى من العالم وله تأثيرات مدمرة ومخربة. منذ بداية القرن التاسع عشر بدأ تفشي المرض بشكل وبائي لسبع مرات اخرها في اندونيسيا عام 1959م وانتقل الى 41 دول اسيوية وافريقية واوربية وحتى بدايات السبعينات للقرن الماضي.

عرفت بكتيريا الـ Vibrio chlerae منذ عام 1854م من قبل الباحث Pacini على انها المسبب للمرض الا انها بقيت تثير شكوك البكتريولوجيين، استناداً الى فرضيات كوخ في هذا المجال حيث عزلت ضمات (Vibrios) غير ضارة من بيئات واسعة اخرى، وعلى الرغم من ان المسبب الرئيسي أو الاصلي لوباء الكوليرا هي بكتيريا Vibrio cholerae الا ان مسبب اخر تم عزله هو Vibrio eltor مع ملاحظة ازدياد عزلهِ من الحالات الوبائية لهذا المرض.

يصاب الانسان بالكوليرا نتيجة لتناوله الماء والغذاء الملوث بضمات الكوليرا من براز الاشخاص الهالكين من الجرثومة. ان تناول الجرثومة يؤدي الى تكاثرها في القناة الهضمية وبعد 2 - 5 ايام تظهر الاعراض المتمثلة بالغثيان، التقيء، الاسهال الحاد مع مغص حاد في البطن. ان فقدان السوائل من القناة الهضمية على شكل براز مائي يشبه ماء الرز وبمقدار 20 لتر يومياً يؤدي الى الجفاف الحاد تنتج عنه الصدمة وبالتالي الوفاة. وفي حالة عدم استخدام العلاج يؤدي ذلك الى الوفاة بنسبة 60٪ ويمكن تقليصها الى 10٪ في حالة اعطاء سوائل الالكتروليت المغذية عن طريق الوريد.

كان الاعتقاد السائد بان الإصابة بجرثومة الكوليرا تسبب تلفاً وتدميراً كاملاً للخلايا الطلائية (الظهارية) لجدران الامعاء والتي تؤدي الى تسرب السوائل من خلال جدران القناة الهضمية، الا أن تشريح الجثث بعد الوفاة اظهر وبشكل واضح وجلي ان هذه الخلايا بحالة طبيعية ولا توجد علامات لاي تفاعل ناتج عن التهابات. وقد عرف بعد ذلك بان كل الاعراض المرضية للكوليرا لاتسبب عن خلايا بكتيريا الكوليرا فقط بل انها تنتج كذلك عن راشح المزرعة البكتيرية الخالية من الخلايا مما يشير الى اشتراك سم معين في توليد هذه الاعراض هو عبارة عن سم معوي (Enterotoxin).

أشار كوخ في مقترحاته الى ان داء الكوليرا يسبب عن سم خارجي نشط جداً يفرز من قبل الجرثومة في القناة الهضمية، الا ان هذه الفكرة لم تقبل في الخمسينات من القرن العشرين عندما اوضح De وجماعته ان حقن بكتيريا الكوليرا أو راشح مزرعة من الخلايا في قطعة مربوطة من المعي اللفائفي للارنب داخل الجسم الحي يؤدي الى تجمع وتراكم للسوائل في الجزء الانبوبي المعقود وبالتالي الى انتفاخ ذلك الجزء.

بعدها في عام 1960 تم تنقية السم من قبل الباحث Finklestein وجماعته حيث تم دراسة امراضية داء الكوليرا على المستوى الجزيئي. أوضح Finklestein وجماعته بان سم الكوليرا يطلق عليه احياناً بـ (Choleragen) وهو عبارة عن بروتين ذي وزن جزيئي حوالي 84000 دالتون (Linton,1986; Stephen pietrowski,1991; Timbury et al.,2002).

في الدراسات الاولى لتنقية السم وجد السم ملوثاً بجزء بروتيني اصغر ذي وزن جزيئي 56000 دالتون غير سام ولكنه من الناحية السيرولوجية مطابق أو مماثل لسم الكوليرا وقد عُرفَ ذلك في البداية على انه السم الموهن (Toxoid)

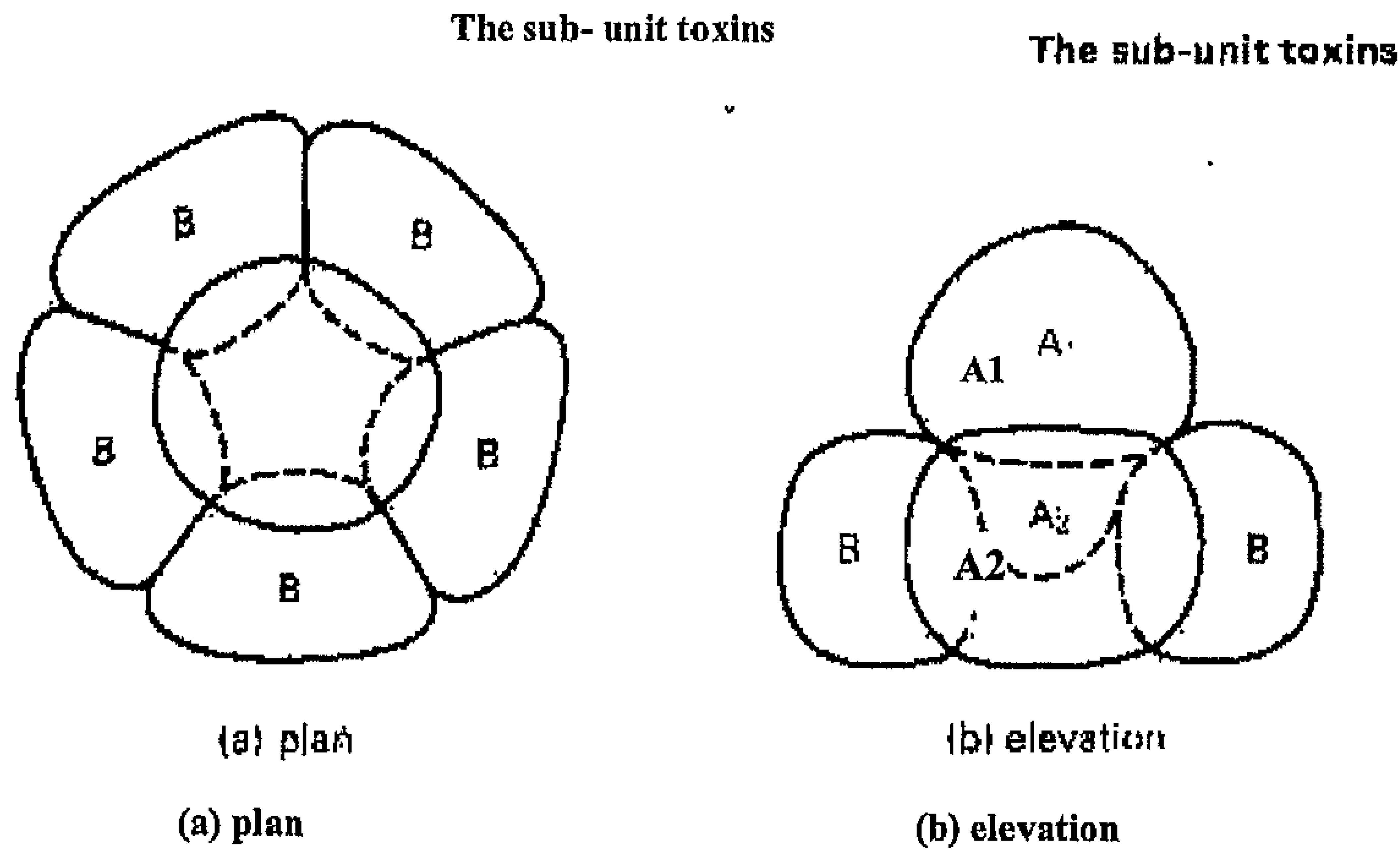
الموجود بصورة طبيعية لسم الكوليرا. ان وجود هذا الجزء البروتيني غير السام المماثل سرولوجياً لسم الكوليرا و ذو وزن جزيئي واطىء، يشير الى ان سم الكوليرا يتكون من وحدات فرعية أو جزئية وربما يشابه سم الخناق. هذا وقد اثبتت دراسات الترحيل الكهربائي بوجود مادة (SDS) الى ان سم الكوليرا يتكون من نصفين بروتينين، الاول ذو وزن جزيئي هو 28000 دالتون يطلق عليه بالجزء (A) والثاني ذو وزن جزيئي 56000 دالتون يطلق عليه بالجزء (B). عند اخضاع السم الى ظروف فصل مؤثرة وفاعلة فإن شطر الجزء ذي الوزن الجزيئي 56000 دالتون يمكن ان يتولد عنه خمسة اجزاء بروتينية صغيرة ذو وزن جزيئي 11000 دالتن. وان شطر الجزء ذا الوزن الجزيئي 28000 دالتون يمكن ان يتولد عنه جزئين بروتينين ذي وزن جزيئي 23000 والاخر ذو وزن جزيئي 5000 يطلق عليه بـ A_1 و A_2 على التوالي وعليه فهو بذلك يشابه سم الخناق بانه يتكون من شطرين أو جزئين بروتينين يطلق عليهما A و B . ولا يشابه سم الخناق كون الوحدات الجزيئية A و B تتربط مع بعضها باصرة غير تساهمية. ان الوحدة الجزيئية A تتألف من جزيئة متعددة ببتيدات واحدة والتي تفلق بفعل الانزيمات المحللة للبروتينات، كما هي الحالة في سم الخناق، الى الاجزاء A_1 و A_2 ولهذا اطلق عليها بكسرة بروتينية أو قطعة بروتينية، في حين شطرا A و B يطلق عليها بالوحدات الجزيئية البروتينية.

ان الوحدات الخمسة الفرعية للجزء B لسم الكوليرا تُكَون تركيباً خماسياً ثابتاً ومستقراً لذلك فإن تفاعلات الوحدات الفرعية لهذا الجزء مع بعضها تكون متساوية. ان التفسير الوحيد لتكوين مثل هذا التركيب الخماسي المستقر يتحقق من خلال تكوين حلقة حول ثقب أو فراغ مركزي كما في الشكل (9-3). وان وحدة فرعية مفردة من الجزء A (A_1) تقع تقريباً على محور هذه الحلقة المغلقة وتقع A_2 باتجاه الثقب أو الفراغ المركزي. ان هذا الوصف متسندٌ الى دراسات

الجهر الالكتروني. ان ارتباط الجزء A الى B من السم يتم بواسطة ارتباط غير تساهمي بين A_2 واحد وحدات الجزء B(Holmgren et al., 1993).

9

ان نشاط سم الكوليرا هو تحفيز نشاط انزيم Adenylate cyclase للغشاء المخاطي للامعاء وعليه فإن عملية الاسهال التي ترافق الاصابة بهذا المرض اصبحت واضحة ومفهومة لان تحفيز هذا الانزيم في القناة الهضمية يؤدي الى تغير في عملية انتقال الايونات من سطح الغشاء المخاطي للامعاء. ان فعل سم الكوليرا يشابه أو يحاكي تماماً تأثير مادة Adenosin monophosphate (AMP) .



شكل 9-3 : ترتيب الوحدات الفرعية أو الجزيئية لسم الكوليرا
(Stephen & Pietrowski, 1981)

ان تنشيط انزيم Adenylate cyclase يؤدي الى تراكم Adenosine (cAMP) 3.5 – cyclic monophosphate - الذي يحتوي على عملية انتقال الالكتروليت (الايونات) ويحدث هذا في الطبقة الظهارية لجدار القناة الهضمية وهذا يؤدي الى صب أو فقدان المحاليل المتعادلة كنتيجة لذلك. عليه فإن نشاط السم لا يكون باحداثه تأثير سمي مباشر بل نتيجة لتأثيره المفرط على عملية فسلجة نوعية

متخصصة حيث ان أي خلل فيها يؤدي الى حدوث حالة مرضية شديدة ولهذا السبب فإن قسماً من العلماء لديهم تحفظ حول اعتبار هذا السم سماً حقيقياً.

ان الوحدة الجزيئية A هي المكون المسؤول عن تنشيط انزيم (Adenylate cyclase) في الطبقة الظهارية (الطلائية) للقناة أو الجهاز الهضمي. اما الوحدة الجزئية B فهي المسؤولة عن ربط السم ككل وعلى المستوى الجزيئي بغشاء الخلية عبر جزء مستقبل أو متقبل (Receptor) في غشاء الخلية، وعليه فإن ارتباط الجزيئة الكلية للسم بالطبقة الظهارية لجدار القناة الهضمية يتم عبر الوحدة الجزيئة (B) وبذلك يتشبع الجزء الخارجي من جدار خلايا القناة الهضمية بجزيئات السم ثم يبدأ تفاعل الوحدة الفرعية (A) بصورة مباشرة أو غير مباشرة بتنشيط انزيم Adenylate cyclase وكنتيجة لهذا التفاعل يبدأ تدفق السوائل الى الامعاء الدقيقة وبالتالي يؤدي الى الاسهال.

د - السموم المعوية لبكتيريا القولون E coli enterotoxin

من المعروف ان البيئة الطبيعية لبكتيريا الـ E coli هو الجهاز الهضمي للانسان من ذوات الدم الحار والطيور المختلفة . وتعريف الاجناس والانواع على اساس الصفات أو التفاعلات البايوكيميائية . ضمن النوع الواحد توجد انواع مصلية مختلفة تعرف على اساس المستضدات (الانتيجنات) الجسمية "Somatic O" والسطحية "Surface K" والسوطية "Flagellar H" ومنها 164 مجموعة O و56 مجموعة H معرفة ولكن لوحظ بان هناك سلالات من بكتيريا الـ E. coli تسبب اسهالاً حاداً في الانسان والحيوانات، كما لوحظ تواجد بكتيريا القولون في بعض حالات الاسهال الناتجة عن الكوليرا.

عند حقن السلالات من بكتيريا القولون المعوية المرضية في قطعة مربوطة من المعي اللفائفي ينتج عن ذلك تجمع للسوائل بطريقة مشابهة لميكانيكية بكتيريا

الكوليرا كما يمكن اظهار الامراض عند حقن راشح البكتيريا الخالي من الخلايا الحية. كما اشارت الدراسات الى ان سلالات بكتيريا القولون المعوية المرضية تنتج سماً معوياً غير ثابت بالحرارة (Heat labile LT) . واحياناً تنتج سما معويا ثابت بالحرارة (Heat stable ST). ان بكتيريا القولون المعوية المنتجة لسم ST لوحده تكون قليلة التردد في الاصابات الا انها ذات اهمية. كما ان عملية انتاج السم المعوي ST و LT يسيطر عليها بواسطة البلازميدات (Plasmids) القابلة للانتقال وعليه فإن الكائن الحي الحامل لهذه البلازميدات له القدرة على نقل قابلية توليد السموم المعوية الى انواع اخرى من بكتيريا السالبة لجرام وهذا يمكن ان يفسر انتاج السم المعوي من قبل سلالات من بكتيريا الـ Salmonella و Yersinia و Pseudomonas .

9

- السم المعوي الغير ثابت بالحرارة (LT).

يعمل هذا السم الى تحفيز نشاط انزيم Adenylate cyclase وهو بذلك ظاهرياً يشبه فعل سم الكوليرا. ولكن الى أي مستوى يتطابق فعل سم (LT) مع فعل سم الكوليرا فهو غير مفهوم بشكل نهائي بسبب عدم امكانية عزل سم (LT) بحالته النقية النشطة. عدد من الباحثين تمكنوا من عزل سم (LT) البروتيني بوزن جزيئي يتراوح بين 80000 و 105000 دالتون. وعلى اية حال فقد لوحظ بان تحضيرات من هذا السم يمكن ان تنشط عند معاملتها بانزيم التريسين المحلل للمواد البروتينية. وقد شجع ذلك الاقتراح السائد حول سم LT بانه يتكون من مركب متعدد الببتيدات ذي وزن جزيئي عالي يطلق عليه بسم أولي (Protoxin) وان السم المعوي هو ناتج التحلل البروتيني المنفلق من ذلك المركب المتعدد الببتيدات. ومما يؤكد هذه المعلومات بان سم (LT) المعزول من الفراغ حول الشبكة البروتوبلازمية في بكتيريا القولون المعوية ذات وزن جزيئي واطيء نسبياً. ان سم (LT) من الناحية المستضدية (الانتيجينية) مشابهة الى سم الكوليرا

أي ان الاضداد (الاجسام المضادة) المحفزة ضد أيٍ منهم لها فعل معادلة التأثير السام للاخر. عليه فإن سم (LT) يجب ان يمتلك منطقة أو جزءاً مشابهاً من الناحية المستضدية، على الاقل لجزء الوحدة الجزيئية B من سم الكوليرا. هذا بالاضافة الى احتوائه على صفات سم الكوليرا الوحدة الجزيئية B فإن سم (LT) يظهر صفات مشابهة لجزء A_1 من الكوليراجين (Choleragen).

كما وضح عدد من الباحثين بان ناتج السم المعوي المتحرر من الفراغ حول الشبكة البروتوبلازمية للخلايا E coli له وزن جزيئي مشابه للوزن الجزيئي للجزء A_1 من سم الكوليرا ويحفز نشاط *انزيم (Adenylate cyclase). كما اوضحت التقارير بأن سم (LT) يمتلك نشاط انزيم ADP ribosylation كما في جزء A_1 لسم الكوليرا وبذلك يمكن في حالة عدم كونهما متطابقين فعلاً فهما قريبان جداً من بعضهما. كما اشارت دراسات الهندسة الوراثية من خلال الترسيب المناعي باستخدام الترحيل الكهربائي من وجود بروتينين احدهما ذو وزن جزيئي 11500 دالتون أي مقارب لسم الكوليرا الوحدة الجزيئية B والاخر ذو وزن جزيئي حوالي 25500 دالتون والذي يشابه الجزء A_1.

ان التشابه بين سم (LT) وسم الكوليرا كبير جداً مما يشير احتمال كونهما سلفين لجد واحد . وفي الحقيقة فإن سم (LT) يختلف عن سم الكوليرا وظيفياً لعدم احتوائه على جزء أو شطر A_2 الخاص بسم الكوليرا (Sixma et al.,1993).

- السم المعوي الثابت بالحرارة (ST).

السم المعوي المنتج من بكتيريا الـ E coli الثابت بالحرارة يختلف كلياً عن السم المعوي الغير ثابت بالحرارة LT بكونه يفقد الخاصية المستضدية (الانتيجنية) وله وزن جزيئي واطئ جداً يتراوح بين 4500-5000 دالتون. وقد تم عزل وتنقية سم ST وذلك لدراسة نشاط أو آلية عمله خارج الخلية الحية in vitro. ولقد وجد ظاهرياً بانه مشابه لفعل سم LT وسم الكوليرا حيث يؤدي الى زيادة

في التيار الكهربائي لدائرة قصيرة المار عبر قطعة مربوطة من المعي اللفائفي للارنب المستخدمة في جهاز (Ussing chamber). وعلى اية حال فإن هذا السم ST يختلف عن سم LT وعن سم الكوليرا بان التغير الذي يرافق عمله على مستوى الخلية يؤدي الى زيادة في Cyclic GMP وليس Cyclic AMP. وهناك صفة اخرى يختلف بها ST عن LT وسم الكوليرا بان ST ينقل اشارته بسرعة عبر غشاء الخلية مؤدياً الى تغير في نشاط انزيم Cyclase والتي يمكن عكسها بمجرد انفصال ST من غشاء الخلية. وعلى اية حال فإن ST يمكن ان يسبب الاسهال من خلال تنشيط الانزيم Guanylate cyclase في الغشاء المخاطي للامعاء. ولكن بطريقة مشابهة لتأثير الهرمونات اكثر من تشابهه مع آلية فعل السموم المعوية البكتيرية.

9

ولعل من المهم بان نذكر هنا بان السموم المعوية لبكتيريا القولون E coli عامل مهم لتعين الاضرار المعوية المرضية وهما عاملان مهمان في التعبير عن الضراوة أو الفوعة ، وذلك لان بكتيريا الـ E. coli التي تفقد قابليتها على الالتصاق بجدار الامعاء لا يمكنها ان تسبب الاسهال على الرغم من احتوائها على السموم المعوية. كذلك هناك بعض السلالات من هذه البكتيريا التي تصيب الخنازير Pigs عندما يفقد المتقبل أو المستقبل في جدار الامعاء في هذا الحيوان تفقد البكتيريا قابليتها على اصابته بالاسهال. وبناءً على ذلك فإن السموم المعوية لبكتيريا الـ E coli هي عوامل تحديد الضراوة أو الفوعة وليس احداث الاصابة المرضية (Nair& Takeda, 1998; Giannella,1995).

هـ- **السموم العصبية**: سم الكزاز والسم البوتيوليني .

على الرغم من ان هذين السمين يسببان اعراضاً مرضية مختلفة عن بعضها إلاّ ان التشابه بين التركيب والوظيفة لكليهما ترجح وضعهم ضمن نفس المجموعة التصنيفية.

أولاً: سم الكزاز

ان الصفات المميزة للاصابة السريرية بسم الكزاز ونسبة الوفيات العالية 40-78٪ الناتجة عن الاصابة ادت الى الاهتمام بهذا المرض منذ قرون. ان الوصف الاول لهذا المرض قد وجد في كتاب سقراط 450-355 قبل الميلاد. يصيب المرض الانسان والحيوانات ذوي الدم الحار. سبورات الجرثومة منتشرة بصورة واسعة في الطبيعة واحياناً يمكن عزلها من براز الاشخاص والحيوانات وغالباً تكون موجودة في الترب المسمدة بالاسمدة الحيوانية عنها في الترب القاحلة أو غير المزروعة. تنتج الاصابة عن تلوث الجروح الطبيعية أو اثناء العمليات الجراحية بسبورات بكتيريا الـ Clostridium tetani ، بعد عملية إنبات السبورات داخل موقع الاصابة تتكاثر الخلايا الحية موقعياً وتمتاز بان قدرتها على غزو انسجة المضيف المصاب تكون ضعيفة أو محدودة جداً. عليه فإن ظهور الاعراض في مكان بعيد عن موقع الاصابة يشير الى انتقال المادة السامة الى مواقع اخرى.

يعاني الاشخاص المصابون بمرض الكزاز في بداية الامر من تقلصات عضلية خفيفة في أو قرب موقع الجرح تزداد بعدها الاعراض مؤدية الى انهيار المصاب نتيجة تشنجات عنيفة وقاسية في جذع واطراف المصاب ويرافق هذه التشنجات العنيفة تشنج عضلات الفك واحياناً ما يسمى المرض بأسمه. وبذلك يتحقق الموت حتماً نتيجة لفقدان السيطرة على عملية التنفس. ومما يجعل المرض مزعجاً ومؤلماً جداً هو تحسس وادراك المصاب بما يلم به من اعراض والآم طيلة فترة المرض. يطلق على هذا السم العصبي بـTetanospasmin

(Linton, 1986; Stephen & petrowski, 1991; Madigan et al., 2000; Greenwood et al.,2007).

ثانياً: السم البوتيولينى

بكتيريا الـ Clostridium botulinum واسعة الانتشار في الطبيعة وان
سبورات هذه البكتيريا تتواجد في الغبار ، التربة ، ترسبات البحيرات وعلى
السطوح النباتية وكذلك من المحتمل ان تحتوي محتويات الامعاء على سبورات 9
هذه البكتيريا. وفي حالة عدم طهي المواد الغذائية والطعام بصورة جيدة فإن الظروف تشجع على انبات سبورات هذه البكتيريا وبالتالي تقوم الخلايا الخضرية بافراز السم البوتيوليني (العصبي) النشط الذي يعتبر مع سم الكزاز من اشد السموم ضراوة للانسان حيث يتم امتصاصه من خلال جدار الامعاء الى الدورة الدموية مسبباً المرض المعروف بالتسمم البوتيوليني أو الوشيقي. لقد كان الاعتقاد السائد بان حالات التسمم البوتيوليني غير ناتجة عن حالة اصابة بالجرثومة بل نتيجة لتناول السم ، إلاّ ان الدراسات الحديثة اثبتت عكس ذلك حيث تمكن علماء من جامعة كاليفورنيا باثبات نمو البكتيريا في امعاء الاطفال وانتاج كمية من السم قادرة على احداث حالة مرضية خطرة. وعلى الرغم من ان الحالات المميتة المسجلة في المستشفيات الناتجة عن هذه الجرثومة قليلة إلاّ ان حالات وفيات الاطفال الرضع المسببة عن هذه الجرثومة والتي ينتج عنها ما يسمى بحالات الموت المفاجئ في الرضع SIDS (Sudden infant death syndrome) حيث سجلت في الولايات المتحدة من هذا النوع من الاصابات حوالي ما يتراوح بين 8000-10000 حالة في السنة.

لقد قام الباحثان Arnon و Midura من اخذ نماذج سريرية من المصل والانسجة ومحتويات الامعاء من الاطفال بعمر دون السنة الاولى في محاولة لعزل الجرثومة والسم حيث تمكنا من عزل الجرثومة والسم من تسع حالات من اصل مئتين واحدى عشرة حالة (SIDS). كما سجلت حالة واحدة من تسع وستين حالة كانت فيها الوفاة لاسباب اخرى. وعليه فإن بكتيريا الـ Cl. botulinum

ممكن ان تكون حالة اصابة مرضية وممكن ان يعزى لها قسم من حالات الموت المفاجئ في الرضع (SIDS) (Arnon,1997).

من الاعراض لحالات التسمم الغذائي الوشيقي هي الغثيان ، الامساك، الدوار (الدوخة) ، حالات جفاف حادة في الحنجرة حيث تظهر هذه الاعراض اعتيادياً بعد 12-36 ساعة من تناول الغذاء الملوث. بعدها تتطور حالة اضطراب عصبي واضحة جداً والتي تتصف بتوسع في بؤبؤ العين ، الرؤيا المزدوجة ، صعوبة في البلع ، ضعف عام واخيراً شلل في العضلات التنفسية تؤدي الى الوفاة نتيجة الاختناق أو فقدان الاوكسجين. ان اعراض حالات الاصابة في الاطفال الرضع متشابهة تماماً مع الاعراض المذكورة آنفاً. كل هذه الاعراض تعزى الى التأثيرات العصبية المرضية للسم البوتيوليني الذي يعمل بشكل أولي على نقطة الاتصال العصبي العضلي والذي يؤدي الى توقف تقلص العضلات الذي يقود بدوره الى رخو وترهل وشلل. في بعض الحالات ممكن ان يمر السم البوتيوليني عبر ألياف الاعصاب المتحركة الى الحبل الشوكي ويؤدي الى اغلاق نقل الايعازات العصبية.

وتشير البحوث الى إمكانية إستخدام السم البوتيوليني في علاج بعض حالات الحول اوشد عضلات العين حيث تسبب نوع من الاسترخاء في العضلات وبالتالي يقضي على حالة الحول أو الحركة غير الطبيعية لعضلات العين (Averbuch Heller & Leigh, 1997; Kessler& Benecke,1997; Wheeler, 1997).

ثالثاً: تركيب سم الكزاز والسم البوتيوليني

هناك اتفاق شبه مطلق بين الباحثين في حقل السم البوتيوليني وسم الكزاز بان الاثنين يصنعان أو يخلقان على شكل سلاسل مفردة من متعدد الببتيد والتي يكون وزنها الجزيئي بحدود 150000 دالتون وعندما تحرر من قبل البكتيريا

تفلق بفعل الانزيمات المحللة للبروتين الى شقين يتمم احدهما الاخر واللذان يتكونان من جزئين بروتينيين غير متطابقين يطلق عليهما بالجزء A والجزء B.

يكون الجزء A ذا وزن جزيئي 50000 دالتون والجزء B ذا وزن جزيئي 100000 دالتون تحمل سوية بواسطة اصرة ثنائية الكبريت وهي بذلك تشابه 9
من الناحية التركيبية سم الخناق والسموم الاخرى ذات الوحدات الجزيئية.

ان الجزء B من سم الكزاز يكون غير سام وله القدرة على الارتباط أو الالتصاق بغشاء الخلية المعرض للاصابة به وينافس مع جزيئة السم الكلية على مواقع الارتباط النوعية (Specific binding sites).

اما الجزء A فهو غير سام للخلية ولكنه ضروري أو مطلوب لاظهار سمية الجزيئة ككل. ان المعلومات المتوفرة عن الجزء A من سم الكزاز وعن عمل سم الكزاز على المستوى الجزيئي غير كافية مما تحول دون امكانية مقارنتها بالجزء A من السموم الاخرى ذات الوحدات الجزيئية. وسم الكزاز له موقع عمل داخل الخلية يعتمد على نشاط الجزء A من السم.

اما بالنسبة للسم البوتيوليني فعلى الرغم من ان بكتيريا Cl. botulinum تنتج ستة انواع متميزة من هذا السم وتشمل A ، B ، C ، D ، E ، F والتي تختلف عن بعضها في صفاتها المناعية ونوع الحيوانات التي تؤثر عليها إلاّ ان تركيبها ونشاطها متشابهان من حيث الاساس.

لقد واجه الباحثون صعوبات كثيرة في دراسة التركيب الكيميائي وفي فهم آلية عمل السم البوتيوليني بسبب انتاج السم بشكله الخام الذي يمثل مركباً ساماً معقداً جداً يتكون من مكونين متميزين هما Haemogglutinin* ذو وزن جزيئي 500000 دالتون والسم العصبي (السم البوتيوليني) ذو وزن جزيئي 150000

* Haemogglutinin: الذي يقوم بعملية تلازن كريات الدم الحمراء.

دالتون والمشابه لسم الكزاز. ان معقد الهيموجلوتنين والسم العصبي يطلـق عليـه احياناً بسلف السم (Progenitor) والذي يشتق منه السم العصبي.

لقد اوضح باحثون يابانيون من ان سلف السم (Progenitor) يكون مقاوماً لعملية تحليل البروتين بدرجة حموضة واطئة اكثر من السم العصبي لوحده. عليـه فإن جزء الهيماجلوتنين من معقد السم ذي الوزن الجزيئـي العـالي يعمـل علـى حماية جزء السم العصبي من ان يفقد نشاطه من جراء الانزيمـات المحللـة للمـواد البروتينية في القناة الهضمية. ويعتقد معظم الباحثين، في هـذا المجـال ، بـان شـطر السم (الجزء B) يقوم بربط السم بالخلية العصبية وان شطر السم (الجزء A) هـو المسئول عن التأثيرات السمية العصبية.

رابعاً: آلية فعل سم الكزاز والسم البوتيوليني

يكون تأثير الكزاز اكثر نشاط واشد حدة عند اعطائـه مباشـرة عـن طريـق الجهاز العصبي من اعطائه عن طريق مجرى الـدم أو الانـسجة المحيطيـة الاخـرى ويكون تأثيره اقل عند اعطائه عن طريق الفم إلاّ اذا اعطي بجرع عالية.

يقسم مرض الكزاز الى نوعين ، الكزاز العام (الكزاز النازل) ويحـدث بعـد اعطاء السم عن طريق الوريد. هناك فترة غير محددة لا تظهر فيها الاعـراض ثـم تليهـا مرحلـة تـشنج في عـضلات الفـك ثـم تـشنج في كافـة عـضلات الجـذع والاطراف واخيراً تشنجات في عموم الجسم والتي تسبق الموت. هذا النـوع مـن الكزاز مشابه تماماً لحالة الاصابة الطبيعية بالمرض في الإنسان والحيوان.

النوع الثاني هو الكزاز الموقعي (الكزاز الصاعد) يحدث بعد حقن الـسم في الاطراف الخلفية حيث يتبع عملية الحقن الم شديد في عضلات المنطقة المحقونة ثم التشنج. هذه الاعراض تنتـشر باتجـاه صـاعد الى عـضلات الاطـراف الاخـرى والجذع والاطراف الامامية.

يحدث الموت بعد 96 ساعة. وعلى المستوى الجزيئي لا توجد خلايا أو سوائل جسمية محددة ومعروفة ، لحد الان ، تتأثر بفعل سم الكزاز عليه لا توجد تغيرات نسيجية أو كيميائية يمكن من خلالها تحديد آلية فعل أو عمل السموم. كما ان المعلومات المتوفرة عن قابلية انجذاب السم باتجاه الجهاز العصبي محدودة جداً.

ان لسم الكزاز قابلية انجذاب خاصة نحو جزء من نسيج المادة السنجابية للدماغ التي تحتوي على العقد العصبية وعلى مستوى عال من نهايات الاعصاب (مناطق الاشتباك العصبي) خصوصاً اغشية نقاط الاشتباك العصبي. كل هذه مؤشرات عن موقع فعل السم وليس آلية عمله.

تنتقل جزيئات السم الى الجهاز العصبي المركزي وترتبط بالعقد العصبية في النهايات العصبية الحركية ثم تنقل بعدها الى المحور العصبي ومنه الى القطع الشوكية المرتبطة بها.

ان الهدف الاول لفعل السم هو نقاط الاشتباك العصبي في الخلايا العصبية وعند وصولها الى هناك تبدأ بتحفيز الخلايا العصبية الحركية وبعدها تبدأ بتنشيط تحرير ناقلات الايعازات العصبية مثل الجلايسين (Glycin) الى الشقوق في نقاط الاشتباك العصبي. والحصيلة النهائية تكون الشلل التشنجي في العضلات التي يسيطر عليها من خلال هذه المراكزالعصبية.

وباختصار شديد فإن سم الكزاز يعمل على الجهاز المركزي اللاإرادي العاكس ، في الحبل الشوكي ويؤدي الى تهيج مستمر في الخلايا العصبية الحركية وبالتالي الى شلل تشنجي. ان تأثير سم الكزاز على العضلات من خلال تنبيه العضلة عصبياً بفعل عكسي أي يمكن القول بان تقلص العضلة الباسطة يمنع أو يكبح بتقلص العضلة القابضة لذلك فالألياف العصبية الناقلة نحو مركز عصبي تبدأ بتنشيط تقلص العضلة وتكبح الفعل المضاد لعضلة المتقلصة. ان الخلية

العصبية الناقلة نحو مركز عصبي تحفز الخلية العصبية الحركية بواسطة افراز ناقل الايعاز العصبي المنبه الاستيل كولين (Acetylcholin) في نقطة الاشتباك العصبي الحركي. وعليه فإن الخلية العصبية الحركية تحدث تقلص العضلات بواسطة افراز الاستيل كولين في نقطة الاتصال العصبي العضلي. ان التفرعات المختلفة لليف العصبي الواحد تفرز نفس مادة ناقل الايعاز. ان الخلايا العصبية في مناطق الاشتباك العصبي تحتوي على مواد معينة حيث ان تحفيزها يؤدي الى افراز مثبط ناقل الايعاز مادة جلايسين (Glycin) في الجهاز العصبي المركزي ومادة كاما امينو بيوتاريك [Gamma amino butyric acid (GABA)] في المخيخ Cerebellum في نقطة الاشتباك العصبي الحركي تلغي تحفيز الخلية العصبية الحركية وبالتالي تلغي تقلص العضلة. عليه فإن سبب الشلل التشنجي الناتج عن سم الكزاز هو اما زيادة في تحفيز افراز ناقل الايعاز العصبي (Ach) أو الغاء تأثير تحرير مثبط ناقل الايعاز الجلايسين وكاما امينو بيوتاريك علماً بان الشواهد التجريبية ترشح الاحتمال الاخير.

على الرغم من انه معروف لدى الباحثين بان السم البوتيوليني يرتبط من خلال العقد العصبية بالاستيل كولين الموجود في نهايات الاعصاب وبالتالي يمنع تقلص العضلات إلاّ انه وعلى المستوى الجزيئي لم يتم معرفة كيفية عمله. ممكن ان نصف ما متوفر من معلومات قليلة جداً حول فسلجة نهايات الاعصاب والتي تختلف عن نهايات الاعصاب المثبطة والتي وصفت في حالة سم الكزاز. ان الاستيل كولين يخلق من مادة الاستيل والكولين بفعل انزيم Choline acetyl tansferase ثم يرسل الى نقطة الاشتباك العصبي. ان الايعاز العصبي يسبب تدفقاً سريعاً لايون الكالسيوم والذي بدوره يؤدي الى نفاذ الاستيل كولين وذلك بخروجه الى خارج الخلية بعدها يرتبط بمستقبل خاص أو نوعي في العضلة أو في جسم الخلية العصبية مؤدٍ الى ازالة الاستقطاب. لذلك

فإن الايعاز العصبي اما ان يتسرب أو يعـاني مـن فلـق الى الاسـتات (Acetate) والكولين (Cholin) والتي تؤخذ من قبل نهايات الاعصاب لاعادة بناء الاسـتيل كوين. طبقاً لهذا الوصف فإن السم البوتيوليني يمكن ان يسبب الشلل الرخو عن طريق احتمالين اما انه يمنع تكوين الاستيل كولين ناقل الايعاز العـصبي أو يمنـع 9
تحريره ،(Singh & Read, 1995; Schiavo & Montecucco,1997).

و- الكولسين Colicins E_3 & E_2

ان بعض انواع بكتيريا القولون تنتج مواداً بروتينية سامة لها صـفات مماثلـة لتلك التي تتصف بها السموم البروتينية إلاّ ان تأثير مفعولها السمي يكـون فقـط على خلايا البكتيريا من سلالات اخرى وليس لها تـأثير علـى الخلايـا الحقيقيـة (Eukaryotic cells).

ان الكولسين E_3 يحرر من قبل بكتيريا القولون التي تحمل البلازميد نوع Col E_3 ثم يتبع ذلـك ارتبـاط الكولـسين بمستقبل نـوعي خـاص بالخلايـا المعرضـة للاصابة به. وبعد فترة قصيرة تبدأ عملية تكوين البروتين الناتجة عن انفلاق جزء من 50 نيوكليوتايد من موقع 3^- نهايـة 16_S لرايبـوزوم RNA (3^- end of 16_S ribosomal RNA) ، لجزيئة كاملة وسليمة مـن الرايبـوزوم ، لـذلك فـإن موقـع عمل الكولسين داخل الخلية.

الكائنات الحية التي تحمل بلازميد Col E_3 تكون ممنعـة ضـد الكولـسين E_3. ان هذه المناعة تختلف عن مقاومة الانواع مـن الاحيـاء الاخـرى الـتي تفتقـد الى موقع الارتباط النوعي وذلك بتكوينها بروتين حامضي يشفر مـن قبـل بلازميـد معين يطلق عليه بروتين المناعة E_3 والذي يرتبط بالكولسين E_3 ويمنعه من تحميل (Inactivation) الرايبوزوم.

ان الكولسين النقي يحتوي على جزء ذي وزن جزيئي 50000 دالتون يطلق عليه *E أو البروتين A وجزء اخر ذي وزن جزيئي 10000 دالتون يطلق بروتين المناعة. البروتين A يكون اكثر نشطا في الخلايا التي تكون خالية من انظمة تصنيع البروتين من الكولسين E_3 نفسه إلاّ انه لا يتحتوي على اية نشاط قاتل للبكتيريا مما يشير الى انه يحمي الخلايا المولدة للكولسين من البروتين A.

اما جزء بروتين المناعة فهو يشترك في ربط الكولسين بالخلايا المعرضة للاصابة به. عليه فإن علاقة التركيب بالوظيفة للكولسين E_3 تبدو انها مشابهة لسم الكوليرا في كونهما يحتويان على بروتين ارتباط أو بروتين مناعة والذي يرتبط بصورة غير تساهمية بوحدة متعدد الببتيد المتمثلة بالبروتين A وهذا بدوره يتفاعل مع غشاء الخلية المعرضة للاصابة بطريقة معينة أو بناتج المتحلل البروتيني منه ثم يحرر الى داخل سايتوبلازم الخلية ليحدث تأثيره السام. اما بالنسبة الى آلية دخول الكولسين الى داخل الخلية فانه يتم بطريقة مختلفة عن دخول سم الكوليرا إلاّ انه يجب عليه العبور من خلال جدار الخلية. ولقد اقترح بعض الباحثين بان مستقبل الكولسين والذي ربما يكون عبارة عن جلايكوبروتين محتمل ان يقع في نقطة التحام جدار الخلية بغشاء الخلية مما يسهل عملية دخوله.

اما بالنسبة الى الكولسين E_2 والذي يكون موقع عمله داخل الخلية إلاّ انه يظهر نشاط انزيمي خارج الخلية تتمثل بنشاط Deoxyribonuclease تحليل الحامض النووي الديوكسي رايبوز.

3. السموم التالفة للاغشية
Membrane damaging toxins

سيتم التركيز على المواد السامة التي تعمل على تدمير أو اعاقة عمل 9
المكونات الاساسية للاغشية الخلوية والتي تؤدي الى فقدان وظيفتها أو تمزيق هذه الاغشية. من المعروف ان الاغشية بصورة عامة تتكون من المواد البروتينية والمواد الدهنية والتي تمثل اهم الاهداف لفعل السموم. وسيتم التأكيد على السموم (الإنزيمية) المحللة للمواد الدهنية المفسفرة دون السموم (الإنزيمية) المحللة للبروتينات وذلك لعدم وجود ادلة واضحة على كون الاخيرة لها دور نشط أو مهم على الاقل ضمن مفهوم الامراضية في اتلاف الاغشية. ان الانزيمات المحللة للبروتينات لها اهمية في موضوع تحليل الانسجة الرابطة. عليه سيتم استعراض مجموعة من السموم ذات الطبيعة الانزيمية المحللة للمواد الدهنية المفسفرة وكذلك مجموعة الانزيمات المنشطة بالثايول ومواد اخرى لها نشاط مشابه لعمل المطهرات والمنظفات على الاغشية الحية هذا بالاضافة الى مواد سامة اخرى لم تحدد آلية فعلها الاولية. ان النتيجة النهائية لتفاعل السم مع غشاء الخلية ليس بالضرورة تحلل الخلايا بل قد تزيد من قابلية نضوجها أو تجعلها قابلة للكسر.

أ- السموم المحللة للمركبات الدهنية المفسفرة

Phospholipase activity.

اولاً: سموم بكتيريا Clostridium perfringens سم الفا (α toxin) .

كما هو معروف بان جنس الكلوستريديوم هو من الاجناس الاكثر انتاجاً للسموم وان بكتريا الـ Clostridium perfringens هي واحدة من الانواع الاكثر انتاجاً للسموم ايضاً. هذا النوع مع الانواع الاخرى والتي تشمل Cl. novyi،

Cl. septicum و Cl. histolyticum هي مسببات مرض الجـانجرين الغـازي (Gas gangrene). وعلى الـرغم مـن ان هـذا المـرض قليـل الحـدوث إلاّ في حـالات الحروب إلاّ انه مرض قاتل ومميت اذا لم يعـط معالجـة سـريعة. يتـسبب مـرض الجـانجرين نتيجـة لتلـوث الجـروح العميقـة للعـضلات بواسـطة سـبورات الكولوستردیا من التربة حيث تنبت السبورات في بيئة معقدة جـداً ذي Eh و pH واطئة.

يتبع ذلك نمو الخلايا الخضرية وانتاج السموم القاتلة للانسجة المحيطة بها مما تشجع على تهيئة الظروف لانتـشار الخلايـا الى منـاطق ابعـد. ان قابليـة الغـزو والانتشار لهذه البكتيريا يعتمد على نوع الـسلالة. ومـن البـؤرة الاوليـة لمنطقـة النسيج الميت تتولد كمية من السموم وتنتشر الى بقية انحاء الجسم مؤدية الى حالة التسمم العام وبالتالي الصدمة المؤدية الى الوفاة. تحدث عملية انتشار الـسموم في الجسم ، وذلك لان عملية تحطيم العـضلات لا تـؤدي الى المـوت الـسريع ، وفي الحقيقة فإن الاستئصال المبكر للاطراف المصابة وسيلة سريعة وكفـوءة للمعالجـة ومنع الوفاة للشخص المصاب. كمـا ان اعطـاء المـضادات الحياتيـة أو مـضادات السموم بصورة مبكرة يكون مؤثراً في معالجة أو منع حالة الوفـاة عنـد الاصـابة التجريبية في الحيوانات.

يتكون سم الفا على شكل سم أولي (Protoxin) خامل والذي يتحـول الى شكله النشط بواسطة ايون الزنك Zn^{+2}.

ومن الناحية البيولوجية فإن سم الفا يكون قاتلاً ويـسبب المـوت الموضـعي للانسجة خصوصاً نسيج أو طبقة البشرة ، عند حقنـه تحـت الجلـد بجـرع تحـت المميتة وكذلك يكون محللاً للـدم ويمتـاز بقابليتـه النـشطة علـى تحليـل اللـسثين ويكون السم الثابت عند تعرضه للحـرارة. ينـتج الـسم بكميـة كـبيرة مـن قبـل

بكتيريا الـ Clostridium perfringens نـوع A وبكميـات اقـل مـن قبـل الانـواع الاخرى من بكتيريا Cl. perfringens الانواع E-B. يمكن تقدير كمية السم مختبرياً اعتماداً على درجة نشاطة في تحليل مادة السثين في الوسط المغذي الحاوي علـى صفار البيض أو اعتماداً على نشاطة في تحليل كريات الـدم الحمـراء في الوسـط الحاوي على دم الفئران أو بواسطة نشاطة المسببة للموت الموضـعي للنـسيج. ان سم الفا هو الانزيم المحلل لمادة اللسثين C وهو النوع الشائع في الاحياء المجهريـة. حيث يعمل على فلق أو فصل مادة اللسثين الى مكوناتها وهي الفسفوريل كولين (Phosphorylcholine) والستيريل اوليل كلسيرايد (Stearyloleyl - glyceride).

ان نشاط سم الفا على تحليل كريات الدم الحمراء ربما نتيجة لفعله الانزيمي (Lecithinase) على مادة الدهنيات المفسفرة الموجودة في غشاء الكريـة الحمـراء. ان كل هذه الأنشطة تعتمد على وجود ايون الكالسيوم Ca^{+2}.

اما بالنسبة لدور هذا السم في حدوث الاصـابة بمـا ان حـالات كـثيرة مـن الجانجرين الغازي تحدث نتيجة الاصابة ببكتيريا Cl. perfringens نوع A لوحدها والتي تنتج بصورة رئيسية سم الفا من بين انواع اخرى من السموم القاتلة كذلك تم التركيز على الدور الذي يلعبه هذا السم في حدوث المرض.

إن نشاط هذا السم لوحده أو مع نشاط سموم اخرى متـورط أومتـورطين في توليد الضرر الموقعي أو القرح الموضعي أو في احداث حالة التسمم العام. ان وجود حالة استسقاء فادحة Oedema والتي هي الصفة المميزة لهذا المرض تكـون نتيجة التغير في قابلية النضوح للاوعية الشعرية والتي هي نتيجة لفعـل سـم الفـا على الاغشية الخلوية. ان الفحوصات النسيجية التي اجريت على مناطق الـضرر أو التقرحات في الانسان قد اظهرت تحرير كريات دهنية (نتيجة لفعل سـم الفـا α) ، وتحطيم الياف الكـولاجين (نتيجـة لفعـل سـم كابـا K) ، وفقـدان للمـادة

السمنتية الرابطة (نتيجة لفعل سم ميو μ) وعدم وجود الفـايبرين (نتيجـة لفعـل سم الفا α ، جاما δ وثيتا θ).

كل هذه التغيرات ممكن ان تنتج اذا تم تعريض عضلة مـستأصلة الى راشـح بكتيريا الـ Cl. Perfringens نوع A. وان الاختلاف الأساسي الوحيـد هـو عـدم تكوين حالة الاستسقاء والغازات المنتجة والتي هي بسبب المضيف والكائن الحي المجهري والتي تكون مهمة في نشر الاصابة وفتح الانسجة الحية.

بالرغم من كل هذه الملاحظات إلاّ انه لا يوجد اتفاق جماعي في الرأي عـن الدور المهم والحاسم لسم الفا فيما يسببه في حالة الجانجرين الغازية.

وهنا لابد من الاشارة عن مدى الـصعوبة الـتي تواجـه البـاحثين والعلمـاء احياناً في تحديد ما تلعبه بعض السموم من ادوار في تعيين الامراضـية سـواء لهـا دور محدد أولي أو ثانوي في تحديد المرض. لقد وجد عدد من الباحثين بان هناك علاقة طردية بين ضراوة السلالات مـن بكتيريـا Cl. perfringens نـوع A وبـين قابليتها على توليد سم الفا.

كذلك قيمت المصول الحاوية على مضادات السموم كعلاج وقـائي لحمايـة الحيوانات ضد بكتيريا الـ Cl. Perfringens عنـد اسـتعمالها في فحـص التحـدي القاتل. ووجد بان قوة الحماية لهذه المصول الحاوية على مضادات السموم يكون بسبب تواجد مضاد سم الفا وليس مضاد سم ثيتا θ أو ميو μ أو كابا K. كما ان الدراسات التي اجريت حول المناعة الفاعلة باستخدام انواع مختلفة من الحيوانات عن طريق تمنيعها بالمستضد الثلاثي الحاوي على سـم الفـا المـوهن (مستـضدات Cl. Perfringens ، Cl. Novyi و Cl. Septicum). حيـث وجـد بـان عنـد اجـراء فحص التحدي باعطاء سبورات احدها بطريقة مشابهة لطريقة الاصابة الطبيعية لوحظ بان هناك درجة عالية من الحماية لدى الحيوانات الملقحة بالطريقة اعـلاه

وتستمر لمدة سنة على الاقل بعد التلقيح. ولابد من الاشارة الى بعض النقاط المهمة التي اثيرت حول دور سم الفا في حدوث المرض. ان الحيوانات التي نجت بعد حقن التحدي ، في سنة معينة ، لها عيار (Titer) واطئ من مضاد سم الفا إلاّ ان العيار يرتفع 70 مرة بعد مرور ثلاثة اسابيع من حقن التحدي مرة اخرى. مع العلم بان حيوانات السيطرة تموت بعد مرور 72 ساعة عليه فمن غير المحتمل ان يكون المصل حاوياً على مضادات السموم بحيث ترتفع الى مستوى الحماية من جراء الاستجابة الثانوية الناتجة عن الحقن الثاني في خلال هذه الفترة.

لذلك فإن المستوى الواطئ من مضاد سم الفا يوفر حماية كافية للوقاية من المرض اذا تواجد في بداية وقت الاصابة. كما لوحظ بان النمو وانتاج السم يحدث في آن واحد عند الاصابة لانه من الممكن عزل البكتيريا من منطقة الجرح أو الاصابة بعد مرور عدة اسابيع من حقن التحدي. كما يلاحظ ارتفاع شديد في مستوى مضادات السموم في المصل مما يشير الى ان المناعة هي بسبب مضادات السموم وليس بسبب المضادات البكتيرية. علماً بان هذه الحماية تتحق باستخدام السموم الموهنة (Toxoid) المحضرة صناعياً خارج الجسم الحي in vitro.

اخيراً فإن الاخفاق الحاصل في انقاذ بعض الاشخاص المصابين اثناء الحروب قد يعود الى اعطاء مضادات السموم بعد فترة متأخرة اوان الاصابة ناتجة عن سلالات لها قابلية غزو عالية جداً للانسجة الحية. وعلى اية حال ومن خلال ما تقدم ومن المعلومات المتوفرة عن تركيبة الراشح البكتيري لهذه الجرثومة المنتج خارج الجسم الحي فإن من اكثر الاحتمالات ترجيحاً هو ان المستضد (الانتجين) المسبب لحالة الجانجرين الغازي هو سم الفا.

وتبقى العديد من الاحتمالات والاستفسارات تدور في ذهن الباحثين تتعلق بحسم دور سم الفا في مرض الجانجرين الغازي والتعقيدات الناتجة عن الاصابة

بسبورات هذه الجرثومة سيما وان الاصابة في الطبيعة تتحقق من خلال السبورات ! ماذا لو تم حقن سم الفا بصورة نقية ! وماذا أو اعطيت سبورات البكتيريا المطفرة الفاقدة لقدرتها على تكوين سم الفا! ان العملية ككل هي عبارة عن تعطيل أو اعاقة العمل الناتج بسبب تغيرات الأنشطة الأيضية التي تبدأ بواسطة سم الفا.

(Ajl et al.,1970,1971; linton, 1986; Stephen & Pietrowski, 1991; Madigan et al., 2000; Timbary et al., 2000; Todar, 2008).

ب- السموم الاخرى المحللة للمركبات الدهنية المفسفرة.

السؤال الذي يفرض نفسه هنا هو أ ان كل كائن حي مجهري له القدرة على افراز انزيمات خارجية لها القابلية أو النشاط على تحليل المركبات الدهنية المفسفرة هي احياء مجهرية مرضية؟ ام ان كل الانزيمات المحللة للدهنيات المفسفرة من اصل بكتيري هي مهمة لتعين الفوعة أو الضراوة للكائن الحي؟

ان الاجابة على هذين السؤالين هي طبعاً لا. وذلك لان هناك انزيمان قاتلان هما:

سم الفا الذي تكونه **Cl. perfringens** نوع **A** وسم **Sphingomyelinase D** الذي تكونه بكتيريا الـ **Corynebacterium ovis**.

ان فقدان العلاقة بين الامراضية والقابلية على تكوين السموم المحللة للدهنيات المفسفرة (Phospholipase C) ليس من الصعب فهمها أو تفسيرها لان الكائن المجهري يحتاج الى العديد من الخواص كي يعبر عن نفسه بكونه كائناً حياً ممرضاً ومنها قابليته على الالتصاق بالمضيف ، قدرته على تكوين المستعمرات ، قدرته على التنافس مع بقية الاحياء ، مقاومته لخلايا البلعمة وغيرها من الامور، اضافة الى قدرته على تكوين أو انتاج مواد سامة نشطة داخل الكائن الحي

وبدون الخواص المذكورة آنفاً تكون قدرته على تكوين المواد الانزيمية المحللة أو المواد السامة اقل اهمية.

9 مفهوم السمية ويكون من الافضل التعبير عنها بالفعل مثلاً القابلية على تحليل الدم وليس التعبير عنها بوحدة انزيمية (Enzymatic unit) ، خصوصاً اذا كان من الممكن ان توضح هذه المسألة بان معدل تحلل الدم يعتمد على تركيز كريات الدم الحمراء وبالتالي يمكن تعين km* لانزيم الهيمولايسن (المحلل للدم) ، أي تعكس مقدار قابلية انجذاب الانزيم الى المادة التي يعمل عليها (Substrate) بصورة طبيعية. عليه فإن قيمة Km المعبر عنها في حالة Cl. perfringens نوع A لسم الفا هي اربع مرات اكثر من قيمة Km المعبر عنها في حالة Cl. bifermentans الانزيم المحلل للمواد الدهنية المفسفرة (Phospholipase C).

بذلك فإن السمية (Toxicity) المعبر عنها بالقابلية على القتل أو القابلية على تحلل الدم هي ليست صفة متأصلة أو ملازمة لفعل الانزيمات المحللة للمواد الدهنية المفسفرة ولا تكون صفة ملازمة لقابلية التعرض للانزيم المحلل للمواد الدهنية المفسفرة في الخلايا الحاوية على مادة الليسثين. وعليه يمكن التعبير عنها بانها ناتج سرعة التفاعل بين الانزيم والمادة الفعالةالتي يعمل عليها بصورة طبيعية في داخل الخلية. كما لابد من الاشارة هنا الى ان تحليل المواد الدهنية المفسفرة في الخلايا لا تؤدي الى تكسير أو تحليل الخلايا بالكامل. وعلى سبيل المثال هناك انزيم بيتا المحلل للدم الذي تنتجه بكتيريا من جنس Staphylococcus والذي له تخصص نوعي ضيق للمادة الفعالة التي يعمل عليها ، وهو من نوع الانزيم المحلل للدم الحار – البارد أي ان تحليل كريات الدم الحمراء يحدث عند

* km : (Michaelis menten constant) والذي يساوي تركيز المادة التي تكون فيها سرعة التفاعل الابتدائي تعادل نصف سرعة التفاعل القصوى او العظمى. ويقاس بالمول / لتر ولا يعتمد على تركيز الانزيم.

تعرضها للبرودة بعد حضنها بدرجة حرارة 37م°. بالرغم من ان هـذه الظـاهرة ذات اهمية قليلة جداً داخل الجسم الحي in vivo الى انها جذبت انتبـاه البـاحثين الى تخمين ميكانيكية هذا التفاعل الذي ربما يعتمد على توليد شد علـى الاغـشية الخلوية مما يتعارض مع سلامة وكمال التركيب.

جـ- السموم المحللة للخلايا المنَشّطة بمجموعة الثايول.

تمثل مجموعة من البروتينات المسماة بالانزيمات المحللـة للـدم غـير الثابتـة عنـد تعرضـها للاوكجـسين (Oxygen - labile haemolysins) وذلـك لكونهـا تخْمـل (Inactivated) بصورة عكسية عند تعرضها للهواء، علماً بان اهم صـفة مميـزة لهـذه البروتينات ، والتي اخضعت للدراسات المكثفة ، هي صفة تحليل خلايا الدم الحمراء.

النظرة الحديثة حول نشاط هذه المواد هو انها تنشط بفعل مجموعـة SH وان هذا التنشيط ضروري جداً للتعبير عن نشاط تحلل الدم في خلايـا كريـات الـدم الحمراء المختلفة. ان هـذه المجموعـة مـن البروتينـات (الـسموم المحللـة للخلايـا المنشطة بمجموعة الثايول) تشترك في الصفات التاليـة : تعطـي تفاعـل التـصالب التعادلي بواسطة المصول المناعية ، تحل مدى واسـعاً مـن كريـات الـدم الحمـراء للانواع المختلفة ، تظهر درجة حموضة مثلى ودرجة حرارة مثلى مشابهة لنـشاط تحلل الخلايا ، تكون مميتة وسامة للانسجة القلبية (Cardiotoxic) وتفقد نشاطها عند حقنها مع Erythrocyte ghosts كما انهـا تخمـل بـصورة غـير عكـسية عنـد تفاعلها مع الكوليسترول. ولهذا السبب فقد تم ادراجها ضمن هذه المجموعة مـن السموم لان تفاعلها مع الكوليسترول هو مفتـاح الفعـل الاولى لهـا في الاغـشية المعرضة للاصابة بها والتي تؤدي الى تلف لهذه الاغشية.

يعرض الجدول (9-1) امثلة على بعض الـسموم المحللـة للخلايـا المنـشطة بمجموعة الثايول.

ولابد من الاشارة هنا بانه لحد فترة ليست بالبعيدة لا توجد شـواهد علـى اهمية خطوة الاختزال بالكبريت (S-S) بواسطة مركبات الثايول كآلية للتنـشيط بمركبات (SH). وعلى اية حال فإن تحليل الاحماض الامينية لسم السيرولايـسين (Cerolysin) اظهرت وجود نصفين متبقين من الحامض الاميني الســستين وهـذه 9
من المحتمل ان تقوم بعملية التنشيط بالاختزال.

جدول 9–1 : امثلة على السموم المحللة للخلايا المنشطة بمجموعة الثايول

اسم السم	النوع البكتيري	
Streptolysin O	Streptococci groups A, B, C & G	
Tetanolysin	Clostridium tetani	
Perfringolysin (θ toxin)	Clostridium perfringens	
Botulinolysin	Clostridium botulinum	
Cerolysin	Bacillus cereus	
Bacterial toxins (Stephen & Pietrowski, 1991) المصـــدر		

ان عملية تحلل الدم (Haemolysis) يمكن ان تكـبح أو تثبط بواسـطة هـذه المـواد الـسامة بـصورة غـير عكـسية بواسـطة الكولـسترول والـستيرولايت. ان الخاصية التركيبية الضرورية لعملية الكبح أو التنـشيط هـو وجـود مجموعـة OH علـى ذرات الكربـون C_3 و C_{17} في هــذه المركبـات. ان الخلايـا الحاويـة علـى الكولسترول كخلايا اللبائن هي التي تكون معرضة للاصابة فقط في حين تنعـدم هذه الخاصية في خلايا البكتيريا لعدم احتوائها علـى الكولـسترول حيـث تكـون غير معرضة للاصابة ، بالسموم المحللة للخلايا المنشطة بمجموعة الثايول وهذا ما يشير ويؤكد على كون الكولسترول هو موقع الفعل الاولي لهذه السموم.

لعل من الضروري ذكر بعض الامثلة على هذه السموم التي قسمٌ منهـا لهـا دور نشط في حدوث المرض مثل Streptolysin O المعروف بكونه قاتل للارانب

والفئران والجرذان وخنازير غينيا بفعل تأثيره السام للقلب اكثر من كونه محلل للدم. إلاّ ان هناك بعض السموم مثل Tetanolysin و θ toxin يبدو انها لا تلعب أي دور نشط في التعبير عن المرض.

ان اكثر الدراسات التي اجريت على هذا النوع من السموم تركزت حول Streptolysin O الذي يفرز في حالة اصابة الانسان بالمكورات المسبحية حيث ان ارتفاع مستوى العيار (Titer) مستوى الاجسام المضادة (Anti - streptolysin O antibody) ضد هذا المستضد هو الفحص التشخيصي المعتمد في حالة اصابة الانسان بالمكورات المسبحية.

واخيراً فإن هذه السموم يبدو انها قادرة على ان تلعب دوراً ما في حدوث الاصابة إلاّ ان هذا الموضوع يبقى كجزء من الموضوع الكلي المتعلق بالصورة الكلية وبالقدرات العامة الاخرى للبكتيريا في مسالة تحديد الامراضية.

د- سموم المكورات العنقودية Staphylococcal toxins

ان اصابة الانسان بالمكورات العنقودية تتصف بتكوين قيح موضعي ضمن خراج مطوق أو محصور في البشرة أو في الانسجة تحت الجلدية.

في حالات الاصابة الشديدة بـ Staphylococcus aureus ممكن ان تسبب نقل الخراج الى الاعضاء ، الكلية ، الدماغ ، الانسجة القلبية وقد تسبب التهاب العظام الحاد. ان اصابة الحيوانات بهذه البكتيريا ينتج عنه التهاب الثدي في البقر والماعز وكذلك الكلاب ، كما تسبب تقيحات في البشرة عند الحملان ، الخيول ، الكلاب والدواجن. وتسبب خراجات مزمنة في الخيول مسببة مرض (Botriomycosis) وكذلك التهاب مفاصل العظام (Osteoarthritis) عند الدواجن.

من الواضح ان بكتيريا الـ Staphylococcus aureus طفيلي ناجح جداً حيث يمكنها البقاء على سطوح الاجسام الحية ولها قدرة ملموسة جداً على غزو الانسجة الموضعية. اضافة لما تحتويه من مواد وقدرات على احداث المرض لها القابلية على ان تكيف نفسها لتغير الحالات التي تتعرض لها.

ان بعض السلالات احدثت تغيراً وراثياً في تكوينها مما أهلها للتكيف للبيئة الجديدة وربما حلت محل سلالات الابوين مثلاً المعالجة بالمضاد الحياتي البنسلين حفز بعض هذه السلالات على انتاج كميات اكثر من انزيم بيتا لاكتميز (β - lactamase) ضد البنسلين وبذلك يمكن ان تقاوم فعل هذا المضاد الحيوي.

من المعروف ان بكتيريا الـ Staphylococcus aureus تنتج مدى واسعاً من النواتج قسم منها داخل الخلية والاخر خارج الخلية وان قسماً من هذه المواد معروفة بتأثيرها المدمر والضار للانسجة علماً بان دورها في تحديد الامراضية من الصعب تعريفه بالكامل. هذه النواتج لها تأثير تالف للاغشية الخلوية.

أولاً: سم الفا المحلل للدم α – Haemolysin

من بين كل المواد الذائبة التي تنتجها بكتيريا الـ Staphylococcus aureus يلعب سم الفا دوراً مهماً في الامراضية. حيث يمتاز بكونه محلاً للدم، ساماً للخلايا ومسبباً للموت الموضعي للجلد وكذلك له تأثير قاتل. ان طبيعة المادة المعرضة للاصابة بالسم غير معروفة إلاّ ان معظم نشاطة يتعلق بتلف الاغشية الخلوية واغشية اللايزوزوم *(Lysosome) التي ينتج عنها خللاً واضطراباً في الضغط الاوزموزي أو التناضحي للخلايا. يحلل هذا السم الكريات الدم

* Lysosome: اجسام سايتوبلازمية غنية جداً بالانزيمات المحللة المائية وتوجد في خلايا معينة خصوصاً البلعمية والملتهمة.

الحمراء للارانب ويظهر نشاط اقل اتجاه كريات الدم الحمراء من انواع الحيوانات الاخرى.

ان الأنشطة السمية لتحليل كريات الدم الحمراء يمكن معادلتها كلياً باستخدام مضادات السم. علماً بان اخذ السم عن طريق الامعاء يؤدي الى القتل. ان تأثير فعل السم الاولي يكون على الجهاز العصبي المركزي خصوصاً على ما تحت السرير البصري ومنطقة التحسس البصري وقشرة المخ. كما ان هذا السم يحدث موتاً موضعياً للجلد كذلك يحدث اضطراباً في المناطق غير المحبة للماء في غشاء الخلية. وعلى أية حال فإن الدور الدقيق لهذا السم في المرض لم يحسم بعد .(Bhakdi & Tranum,1991; Bhakdi et al., 1996)

ثانياً: سم بيتا المحل للدم β - Haemolysin

ان مدى تأثير نشاط السم تختلف عن سم الفا كونه نشطاً ضد كريات الدم الحمراء للخراف والثيران والانسان. خارج الجسم الحي in vitro يظهر هذا السم ظاهرة التحلل الحار البارد. ان تعرض كريات الدم الحمراء الحساسة بدرجة حرارة الجسم 37م° تظهر تحلل قليل أو عدم وجود تحلل يعقبها تبريد بدرجة حرارة الغرفة ينتج عنه تحلل كامل لكريات الدم الحمراء. ان سم بيتا يهاجم مادة السفنجومايلين في الغشاء. إلاّ ان هذه هي ليست فعاليتة الوحيدة فعلى الرغم من وجود هذه المادة في غشاء خلايا كريات الدم الحمراء للانسان والخنازير إلاّ انها لا تحلل بفعل السم. كما ان له تأثيراً ساماً للخلايا ويؤدي الى الموت بسبب تأثيره على مادة السفنجومايلين (Sphingomyelin).

من ضمن الخلايا الحساسة لسم بيتا كريات الدم البيضاء (Leucocyte)، الخلايا الملتهمة (Macrophage) ، والصفائح الدموية (Platelets) واجسام اللايزوزوم (Lysosome). وان تأثر الاخيرة قد يكون هو السبب في تلف

الخلايا، ان المعلومات المتوفرة عن فعل سم بيتا ، داخل الجسم ، قليلة جداً ومتضاربة احياناً. بعض العلماء وجد بان ليس هناك تأثير قاتل للسم والاخر وجد بان له تأثيرات على الاوعية القلبية. ولا يزال هذا السم يحتاج الى المزيد من البحث وخصوصاً باستخدام تحضيرات نقية جداً منه.

ثالثاً: سم جاما المحلل للدم δ - Haemolysin

تم عزل السم بحالة نقية جداً إلاّ ان المعروف عن فاعليته البيولوجية قليل جداً. يسبب هذا السم تحرير لإنزيمات اللايزوزوم في كريات الدم البيضاء ذات الاشكال المتعددة النواة (Granulocytes) في منطقة البريتون في الارانب ، ويكون السم قاتلاً عند حقنه عن طريق القلب في خنازير غينيا.

رابعاً: سم دلتا المحلل للدم ∂ - Haemolysin.

يختلف هذا السم عن بقية السموم المحلة للدم كسم الفا ، بيتا وكاما بكونه يحلل كريات الدم الحمراء للانواع المختلفة من الحيوانات بآلية غير انزيمية. ويكون نسبياً ثابتاً بالحرارة غير محب للماء له القدرة على حل انواع مختلفة من الخلايا خارج الجسم الحي in vitro كانواع كريات الدم البيضاء المختلفة وكريات الدم الحمراء. هذه التأثيرات يمكن ان تعادل بواسطة مصل الدم (الفا وبيتا كلوبيولين) والتي من المحتمل ان تكون غير نشطة داخل الجسم الحي invivo.

خامساً: السم المحلل لكريات الدم البيضاء Leucocidin .

لم تحدد هوية الأنشطة البيولوجية لهذا السم إلاّ بعد تنقيته بصورة تامة وفصله عن نشاط الهيمولابسين المحل لكريات الدم الحمراء. علماً بان هناك خلط وتداخل بين نشاط هذا السم وتأثيره البيولوجي ونشاط سم الفا وبيتا من الهيمولابسين. ان نشاط السم المحلل لكريات الدم البيضاء ليس له تأثير على كريات الدم الحمراء وليس له تأثير على الخلايا اللمفاوية أو خلايا الانسجة الاخرى.

ان هذا السم مكون من جزئين (S) البطيء Slow و (F) السريع Fast وان كل واحدة من هذه الجزيئات غير نشطة على حدة ولكن عند جمعها سوية يعملان بالتعاون على اظهار نشاط هذا السم. يحدث هذا السم تلفاً لاغشية خلايا Granulocytes كريات الدم البيضاء ذات النواة المتعددة الاشكال مما يؤدي الى زيادة في عملية النضوح وخلل في ضخ عنصر الصوديوم وبالتالي الى زيادة في تدفق آيون البوتاسيوم مع تأثيرات ثانوية اخرى. علماً بان وجود اجسام مضادة لهذا السم في مصل المرضى المصابين بالمكورات العنقودية يشير إلى ان لهذا السم دوراً في حدوث المرض.

هـ- سموم المكورات المسبحية **Streptococcus toxins**.

ان بكتيريا المكورات المسبحية Streptococci المحللة للدم تنتج مدى واسعاً من السموم والانزيمات الخارجية وتشمل الستربتولايسين 0 (Streptolysin O) ، الستربتولايسين S (Streptolysin S) ، الستربنوكاينيز (Streptokinase) ، الانزيمات المحللة للبروتين (Proteinase) وكذلك الهايليورونيدريز (Hyaluronidase). ان اصابات الانسان المختلفة والمتمثلة بالتهاب الحنجرة ، الحمى القرمزية ، حمى الروماتيزم والتهاب الكلية ، تسببها بكتيريا المكورات المسبحية المحللة للدم نوع بيتا (β) والتي تشخص فيها البكتيريا من خلال ما تكونه من منطقة تحلل لكريات الدم الحمراء شفافة على اطباق اكار الدم حول مستعمرات هذه الجرثومة.

ان من اهم الانواع المرضة للانسان من المكورات المسبحية هي تلك المحللة للدم من نوع بيتا (β) والتي تصنف ضمن مجاميع C, B, A Lance field ، والتي تعتمد على نوعية متعدد السكريات الموجودة ضمن سطح الخلية.

ان من اكثر الانواع امراضية للانسان هي المجموعة A وتصنف هذه المجاميع الرئيسية الى مجاميع فرعية اعتماداً على المستضدات البروتينية وهي M و T أو R. ان المستضد البروتيني M هو عامل الفوعة أو الضراوة والتي يمنع عملية التهام الخلايا بطريقة التبلعم (Phagocytosis). كما يحتوي جدار الخلايا على مادة 9
الببتيدوجلايكين التي تحفز تفاعل شوارتزمان الموضعي. فيما عدا مكونات الجدار الخلوي لهذه المسبحيات المكورة لا يوجد دليل أو شاهد قاطع على اشتراك هذه السموم أو الانزيمات الخارجية لبكتيريا المكورات المسبحية في عملية حدوث المرض اوفي تحديد امراضيتها.

هناك نوعان من العوامل المحللة للخلايا (Cytolytic) معروفة هي الستريتولايسين O والستريتولايسين S.

ان الستريتولايسين O يقع ضمن مجموعة السموم المحللة للخلايا المنشطة بالثايول (Thiol activated cytolysin) التي سبق وان تم شرحها. اما الستريتولايسين S فهو المسؤول عن منطقة التحلل الدموي الكاملة أو الشفافة والتي يطلق عليها بمنطقة بيتا β التي تحيط مستعمرات المكورات المسبحية في طبق اجارالدم. وانه من غير المعروف ان هذا السم ينتج داخل الجسم الحي in vivo لانه ليس لديه نشاط مستضدية وعليه لا تتكون ضده اجسام مضادة في مصل الاشخاص المشافين من المرض.

لم يتم عزل السم بصورة نقية ولكن يعتقد بانه يتكون من 28 حامض اميني وربما انه يرتبط بجزيئة حاملة له ذات طبيعة متغيرة. ان الآلية التي يعمل بها الستربتولايسين S في تحلل كريات الدم الحمراء غير معروفة بصورة تامة ولكنها تختلف عن الآلية التي يعمل بها الستريتولايسين O وهو تأثيره على مادة الدهنيات المفسفرة في جدار الخلية. ان المواد مثل الفسفوتيديلكولين ، الايثانول امين وحامض الفوستوتيدك تكبح فعل الستريتولايسين S والمعاملة المسبقة

للخلايا بانزيم الفوسفولايبيز C تمنع ارتباط السم بالخلية مما يشير الى وجود موقع استقبال للسم على جدار الخلية في منطقة الدهنيات المفسفرة.

ان الستربتولايسين S سام لكريات الدم البيضاء حيث يعمل اما على ازالة الحبيبات وبالتالي موت الخلايا ، أو في التراكيز تحت السامة يمنع عملية التهام أو البلعمة لهذه الخلايا. كما يعمل على تحلل صفائح الدم وانواع اخرى من الخلايا (Cell lines) ويكون قاتلاً للفئران ويؤثر على عدد من الاعضاء كالرئة والكلية والقلب. علماً بان دوره في عملية احداث المرض والاصابة غير معروف .

يتمتع سم streptokinase بخاصية تحليل البروتينات ولذا فقد تم الاستفادة من هذه الخاصية في التطبيقات الطبية العلاجية لمعالجة حالات انسداد الشرايين التي ينتج عنها حالات السكتة القلبية، حيث يعتبر هذا السم منشط قوي وفعال لمولد البلازما (plasminogen) الذي يمنع التخثر (Maseri & Andreotti, 1997; Levine, 1997).

4. السموم ذات الاهمية في حدوث المرض: آلية فعلها غير محددة

9 **Toxins of known importance in the genesis of specific lesions: mode of action un known.**

أ- سم الجمرة الخبيثة Anthrax toxin

ان معظم الحيوانات من ذوات الدم الحار معرضة للاصابة بالجمرة الخبيثة الا ان درجة التعرض وقابلية التعرض للاصابة تختلف من حيوان لاخر. فالحيوانات مثل الماشية والخراف لها قابلية تعرض عالية كذلك الخيول والجاموس والحيوانات من آكلة الاعشاب الخضراء مثل خنازير غينيا وكذلك الفئران.

وهناك حيوانات مثل الكلاب والقطط والجرذان والطيور تكون نسبياً غير معرضة للاصابة بهذه الجرثومة ولكن يمكن اصابتها اصطناعياً. اما بالنسبة للانسان فإن قابلية تعرضه تكون وسطاً بين الحيوانات الشديدة التعرض والحيوانات الغير معرضة للاصابة. ان المرض في معظم الاحيان يكون مميتاً ولكن الاصابة الموضعية هي الاكثر احتمالاً للوقوع ، وان المعالجة بالمضادات الحياتية تكون ناجحة.

هناك شكلان من اشكال الاصابة ببكتيريا الجمرة الخبيثة وهي الاصابة الموضعية (الجلدية) وتحدث عند عدد محدود من الحيوانات كالخنازير والكلاب وتحدث كذلك للانسان.

ان هذه الاصابة ممكن ان تتسبب من خلال الجروح ففي الانسان يحدث هذا النوع من الاصابة لدى القصابين أو باتري ذيول الحيوانات والذين يحملون أو يتعاملون مع اجسام الذبائح الحيوانية أو الجلود المستوردة من دول تكون

سبورات مرض الجمرة الخبيثة مستوطناً فيها. كما ان الحك أو الكشط أو الخدوش التي تحدث من جراء حمل هذه المواد ممكن ان تجعل الشخص معرضاً للاصابة بها.

ان الاصابة في البداية تأخذ شكل انتفاخ استسقائي ، حار مؤلماً ثم يبرد بعد ذلك ويصبح عديم الالم ويأخذ شكل جمرة داكنة اللون يطلق عليها بالجمرة الخبيثة ، في الكلاب والخنازير تحدث الاصابة الموضعية بعد تناول الغذاء والعلف الملوث. تدخل الجرثومة الى انسجة الجزء العلوي من القناة الهضمية من خلال اللوزتين وتؤدي الى حالة من الالتهاب الاستسقائي في انسجة الراس والرقبة كما ان حالة الجمرة الخبيثة العامة أو السامة ممكن ان تحدث نتيجة للاصابة الموضعية.

اما حالة الجمرة الخبيثة العامة فتحدث بعد تناول غذاء ملوث بسبورات هذه الجرثومة أو نتيجة لاستنشاق السبورات عن طريق الفم كما في حالة مرض فرازي الصوف (Wool sorter) في الانسان. حيث تنبت السبورات وتتحول الى عصيات تغزو الجهاز اللمفاوي ومنه تنتقل الى مجرى الدم حيث تتغلب على الجهاز الدفاعي للجسم مكونة تسمماً عاماً ومنتشرة الى كافة انحاء الجسم عند هلاك الحيوان. ونتيجة لذلك تصاب الحيوانات بحمى عالية جداً مع نزف دموي من كل فتحات الجسم مؤدية الى ضيق حاد في التنفس وبالتالي الى الصدمة المؤدية الى الموت خلال ساعات قليلة.

آلية حدوث المرض (الامراضية)

من المعروف حالياً ان حالة الامراضية المتسببة عن الجمرة الخبيثة هي نتيجة لعدد من المواد الميكروبية تفرزها عصيات الجمرة الخبيثة والتي تسبب مجتمعة الاعراض السريرية الكاملة للمرض. حيث لم تعرف حقيقة كون بكتيريا B. anthracis انها مكونة للسم إلاّ بعد عام 1954م.

سجلت عدة ملاحظات حول امراضية هـذه البكتيريـا واقترحـت نظريـات لتفسير أو لشرح آلية حدوث المرض المسبب عن هذه الجرثومة. كمـا ان حقيقـة كون المناعة المتحققة نتيجة الاصابة بهذه الجرثومة تشير الى كون الجرثومـة تنـتج مواداً داخل الجسم الحي ، والتي هي ضرورية لتوليد عوامل الحماية المناعية.

ان السائل المعقد المأخوذ من منطقة الانتفاخ الاستسقائي يحتوي على العوامـل المولدة للمناعة حيث ان حقن هذا السائل في المضائف المعرضة للاصـابة بالجرثومـة تنتج عنه مناعـة. كمـا حُـددت العلاقـة بـين وجـود الكابـسول (Capsule) وشـدة الامراضية أو الفوعة أو الضراوة حيـث وجـد بـان كـل سـلالات بكتيريـا الــ B. anthracis ذات الفوعة الشديدة تكون حاويـة علـى الكابـسول ولكـن ليـست كـل السلالات الحاوية على الكابسول تكون ذات فوعة (ضراوة) حادة.

وهذا يشير الى ان حامض المتعدد الجلوتاميـك (Polyglutamic acid) يكـون وجوده اساسياً لحماية السلالات ذات الفوعة أو الـضراوة الـشديدة ضـد المـواد القاتلة لبكتيريا الجمرة الخبيثـة (Anthracidal) الموجـودة في الـدم وكـذلك ضـد عملية البلعمة التي تقوم بها كريات الدم البيضاء ذات النـواة المتعـددة الاشـكال (Polymorph nuclear leucocyte) ، وعليه فإن الكابسول هـو الوسـيلة الدفاعيـة لحماية بكتيريا الجمرة الخبيثة. كما ان الكابسول مهم جداً لتثبيت أو بدأ حالة الاصابة إلاّ انه من المحتمل ، بان ليس لديه دور في المراحل المتأخرة من المرض. وبناءً على هذا فإن الامراضية لابد ان تعزى الى عوامل اخرى اضافة الى وجود الكابسول.

ان وجود حالة الانتشار والتواجد المكثـف للبكتيريـا في الـدم والـتي تـسبق حالة الهلاك تشير الى اما ان البكتيريا تزيل الاوكسجين مـن الـدم أو انهـا تغلـق الاوعية الدموية بصورة ميكانيكية. وفي الحقيقة فإن هناك حالات لا يوجد فيهـا تواجد شديد للبكتيريا في الدم وتـسبق المـوت عنـد بعـض الحيوانـات. في حـين اوضـح بـاحثون اخـرون بـان هنـاك زيـادة في مـستوى الـسكر في الـدم

(Hyperglycemia) تتداخل مع حالات التوازن الايضي لايون الكالسيوم والذي يؤدي الى ضرر في الجهاز العصبي وهذا الاخير يؤدي الى اعراض الجمرة الخبيثة.

اضافة الى الكابسول هناك على الاقل ثلاثة عوامل نشطة سيرولوجياً ومختلفة عن بعضها من ناحية المستضدات التي تحتويها لوحظ تواجدها في المصل وهي:

عامل الاستسقاء **(I) Oedema factor (OF)**

مستضد الحماية **(II) Protective antigen (PA)**

عامل القتل **(III) Lethal factor (LF)**

اضافة لكون العوامل الثلاثة تختلف عن بعضها مناعياً فإن أي واحد من هذه العوامل الثلاثة يفشل في تكوين أو التعبير عن اية نشاط بيولوجية معينة لوحده ولكن مع بعضهم يعملون كسم معقد واحد.

حيث يشترك PA مع LF للتعبير عن النشاط القاتل و PA مع OF يشتركان في التعبير عن نشاط موت النسيج الموضعي في حين اشتراك EF مع LF لا ينتج عنه اية نشاط. ان معقد هذه العوامل الثلاثة يكون مولداً للمناعة ، قاتلاً ومسبباً للموت الموضعي للنسيج الجلدي.

لم يتفق الباحثون حول الطبيعة الكيميائية لهذه العوامل بالرغم من طرق العزل والاستخلاص المختلفة التي استخدمت لهذا الغرض ولكن هناك اتفاق في الرأي بكونها عوامل غير قابلة للديلزة (Non dialyzable) ، تتلف بالحرارة بروتينية أو دهنية بروتينية.

ان اكتشاف السم داخل الجسم الحي in vivo قد شجع البحث حول عملية انتاج السم خارج الجسم أي خلال الساعات المبكرة لنمو البكتيريا ، إلاّ انه بعد ذلك يختفي بسبب الانزيمات الذاتية المحطمة له.

في البداية تم استخدام اوساط زرعية معقدة تحتوي على مصل الدم بعدها لوحظ ان الاوساط الزرعية التركيبية هي الاخرى ملائمة لانتاج السم اذا ما احتوت على العناصر الاساسية مثل البيكاربونات وتهوية المزيج باستخدام 20٪ من غاز ثاني اوكسيد الكربون حيث له اهمية في انتاج السم وتحريره من الخلية.

اما بالنسبة للاسباب الرئيسية التي تؤدي الى الهلاك نتيجة الاصابة ببكتيريا الجمرة الخبيثة فانها بسبب التأثيرات الثانوية مثل غلق الاوعية الدموية ، عجز الاوعية الدموية القلبية وكذلك بسبب تأثير السم المباشر على الشبكة الاندوبلازمية ، نضوب الاوكسجين ، الصدمة وزيادة نضوحية الاوعية الدموية والعجز التنفسي بسبب الضرر الذي يصيب الجهاز العصبي المركزي الذي يسيطر على عملية التنفس. علماً بان هذه الاسباب لا تزال محض افتراضات وانتقادات بين العلماء والباحثين الذين يعملون في هذا المجال.

ب- السموم المعوية Enterotoxins

أولاً: السموم المعوية لبكتيريا المكورات العنقودية

Staphylococcus enterotoxins

ان حالات التسمم الغذائي الناتجة عن بكتيريا الـ Staphylococcal تختلف من مكان الى اخر ، فهي غير مألوفة مثلاً لدى المملكة المتحدة إلاّ انها تشكل حوالي 40٪ من حالات التسمم الغذائي التي تحصل في الولايات المتحدة الامريكية.

تحدث اعراض التسمم بعد 1-6 ساعات من تناول الغذاء الملوث بالسم وخصوصاً منتجات الالبان ، وتستمر الاعراض لمدة 24 ساعة واحياناً يحدث الموت في حالات نادرة جداً. تحدث حالة التسمم نتيجة لتناول الغذاء الملوث بسم البكتيريا ، كما هي الحالة في حالة التسمم الوشيقي.

السم عبارة عن مجموعة متباينة الخواص من سلسلة منفردة من البروتينات الكروية. يتراوح الوزن الجزيئي له بين 28000-35000 دالتون. وينتج من عدة سلالات من بكتيريا Staphylococcus aureus. هناك ستة انواع من السموم المعوية مختلفة سيرولوجياً هي D, C_2, C_1, B, A و E قد شخصت لحد الان.

وسبب كون استمرارية المرض قصيرة جداً ولا تؤدي الى الوفاة ، إلاّ ما ندر، عليه لا توجد تفاصيل كثيرة عن تأثير هذه السموم على اجهزة واعضاء الجسم بصورة تفصيلية. لان الكثير من التفاصيل المعروفة عن توليد المرض وآلية عمل السم في اللبائن (الثدييات) حيث استخدمت القرود لهذا الغرض. عند اعطاء السم عن طريق الفم يسبب القيء والاسهال واستجابة سريعة لالتهابات حادة في الاغشية المخاطية للامعاء الدقيقة ولا يوجد أي تغير في درجة حرارة الجسم ويكون الشفاء سريعاً (Bhatia & Zahoors, 2007).

كذلك لوحظ ان القيء يحدث عند حقن السم عن طريق الوريد. عليه فإن هذا النوع من السم لا تعتبر من السموم المعوية الكلاسيكية مثل سم الكوليرا وسم بكتيريا القولون التي تؤثر مباشرة على خلايا الامعاء.

ان هذه السموم تحفز وتنبه مواقع الاستقبال أو الارتباط في احشاء البطن وان هذا التحفيز يصل الى مركز القيء عبر العصب الحائر وبذلك يمكن اعتبارها من انواع السموم العصبية.

هناك تاثيرات مختلفة لآلية عمل السم حيث يشير بعض الباحثين الى ان السم يحفز افراز السوائل من جدار الامعاء الدقيقة مثل سم الكوليرا دون ان يؤثر على امتصاص الكلوكوز مما يشير الى سلامة تركيب جدار الامعاء وعدم تأثره بالسم. والراي الاخر يشير الى ان السم يزيد من تدفق سريان ايونات الصوديوم Na^+ والكلور Cl^- أي انه يؤثر على انزيم Adenylate cyclase. وعلى اية حال فإن الحالة تستوجب الكثير من الدراسة والبحث والتحليل.

ثانياً: السم المعوي لبكتيريا الـ Clostridium perfringens

هناك سلالات معينة من بكتيريا Clostridium perfringens نوع A تسبب حالة تسمم غذائي نتيجة لتناول اغذية مطبوخة خصوصاً اللحوم الحاوية على اعداد كبيرة من الخلايا الخضرية لهذه البكتريا. تمتاز اعراض التسمم بالآم في البطن ، اسهال يبدأ بعد 6-24 ساعة من تناول الغذاء الملوث ويتم الشفاء بعد 24 ساعة من ظهور الاعراض. ان المضاعفات والوفيات قد تحدث ولكنها قليلة جداً. تسبب الحالة نتيجة السم المعوي الذي ينتج في الامعاء. ان سبورات البكتيريا من نوع A تبقى حية في درجات حرارة الطبخ المعتدلة ولها القدرة على مقاومة الغليان لمدة 1-4 ساعة وبالتالي لها القدرة على التكاثر والنمو في هذا النوع من اللحوم المطبوخة وعلى هيئة مرزعة نقية حيث ان بقية منافساتها تقتل بفعل الحرارة. كما ان ازالة الاوكسجين اثناء عملية الطبخ بوجود المركبات المختزلة مثل الجلوتاثايون (Glutathione) وعدم وجود الاحياء المنافسة لها كلها عوامل مساعدة على نمو الكلوستريديا خصوصاً اذا تم حفظ الاغذية في جو حار.

ان سلالات بكتيريا الـ Cl. perfringens نوع A المسببة للتسمم الغذائي تختلف عن بقية السلالات الاخرى من نفس النوع بعدم قدرتها على تحلل الدم وتنتج كمية قليلة جداً من سم الفا ولا تنتج سم بيتا اطلاقاً.

ان السم المعوي المنتج من قبل هذه البكتيريا يتأثر بالحرارة وهو عبارة عن بروتين له خاصية مستضدية وذو وزن جزيئي 36000 دالتون. وينتج خارج وداخل الجسم الحي . يحفز السم زيادة في حركة السوائل داخل جوف الامعاء وهو بذلك يشبه سم الكوليرا وسم بكتيريا القولون المعوية وذلك بكونه يعكس صافي سريان ايونات الصوديوم Na^+ والكلور Cl^- والماء من الامتصاص الى الافراز. اضافة الى ان هناك رأي اخر يوضح بان السم يمنع امتصاص الجلوكوز

من الامعاء مما يشير الى ان حصيلة السوائل والايونات المفقودة هي بسبب قلة الامتصاص وليس بسبب زيادة الافراز.

ان تواجد عدد كبير من الخلايا الجرثومية في براز الشخص المصاب والذي يصل الى 10^6 خلية/ غم يمكن ان يستخدم وسيلة للتشخيص لان تواجد الخلايا في الحالة الاعتيادية لا يزيد عن 10^3-10^4 خلية/ غرام.

ثالثاً: السم المعوي لبكتيريا الـ Bacillus cereus

هناك نوعان متميزان من انواع التسمم الغذائي تحدث بواسطة هذه الجرثومة. النوع الكلاسيكي الذي يكون مشابهاً تماماً الى التسمم الذي تسببه بكتيريا الـ Cl. perfringens حيث تظهر الاعراض بعد مرور 10-13 ساعة من تناول الغذاء والذي يتصف بالتهاب غشاء القولون المخاطي الحاد ، الالام في البطن ، اسهال وغثيان وتقيء قليل. ان الاغذية التي تسبب هذا النوع من التسمم تختلف حسب البلد الذي يحصل فيه التسمم اعتماداً على الغذاء المحلي المتوفر في ذلك البلد مثل اللحوم ، منتجات اللحوم ، الفانيلا ، السجق ، الكريمات المختلفة والخضراوات التي تحضر في اجواء رطبة تساعد على التلوث أو نمو البكتيريا.

الشكل الاخر هو الذي يحدث بعد مرور 1-5 ساعة من تناول الغذاء الملوث وهو مشابه للتسمم الحاصل عن بكتيريا Staphylococcus aureus. تتميز الاعراض المصاحبة لهذا التسمم بالتهاب المعدة والامعاء وغثيان مع تقيء. ولقد اكد بعض الباحثين من خلال تجاربهم على التهاب المعدة والامعاء بان هذا التسمم هو نتيجة لوجود السم المسبب للاسهال (Diarrhoeagenic toxin) وهو المسؤول عن الاسهال ، وان القيء بسبب سم اخر هم السم المقيء (Emetic toxin).

هذا النوع من التسمم يعقب تناول الرز المغلي أو المقلي والتي تبقى فيه سبورات البكتيريا حية وبالتالي تتكاثر في الغذاء خصوصاً اذا ما تم حفظه في درجة حرارة الغرفة.

ان ظهور اعراض التسمم السريعة نسبياً مع عدم وجـود حمـى تـشير الى ان التسمم هو بسبب وجود السم. وان اعراض التسمم الغذائي تظهر عندما يكـون تعداد خلايا البكتيريا الحية 10^7 خلية/ غرام.

9 ان السم عبارة عـن بـروتين ذي وزن جزيئـي 50000 دالتـون يـشبه سـم الكوليرا من حيث فعله حيث يحفز فعل انـزيم Adenylate cyclase. كمـا يعمـل على زيادة نضوحية الاوعية الدموية الجلدية في الارنب.

رابعاً: السم المعوي لبكتيريا الـ Shigella.

ان من اهم الاعراض المميـزة لمـرض الــ Shigellosis هـو الاسـهال الحـاد المصحوب بحمى مـع مـوت للطبقـة الظهاريـة (الطلائيـة) لجـدران الامعـاء. ان المرض تسببه بكتيريـا الــ Shigella dysenteriae نـوع I ومـن المحتمـل ان تـسببه الانواع الاخرى كالـ Sh. boydii و Sh. sonnei.

لقد اوضح الباحثون بان راشح بكتيريا الــ Sh. dysenteriae نـوع I يحتـوي على سم عصبي والذي عند حقنه في الحيوانات يـسبب شـلل الاطـراف ويعقبـه الموت. واوضحت تجارب اخرى ان حقن هذا الـسم العـصبي في الارانـب ينـتج عنه ضرراً بالغاً في الطبقة المخاطية للاعور مشابهة لمـا يحـصل في حالـة الاصـابة بالبكتيريا نفسها.

لقد وجد بان السم يحتـوي علـى مكـونين بيولـوجيين نـشطين همـا الـسم البروتيني المسؤول عن الاضـرار في الجهـاز العـصبي والـسم المتعـدد الـسكريات الدهنية (السم الداخلي) المسؤول عن الافرازات من الجهاز الهضمي. ولان السم العصبي لا يسبب نفس الاعراض الناتجـة عـن مـرض Shigellosis فـإن دوره في امراضية بكتيريا الـ Sh. Dysenteriae قد اهمل.

اوضحت دراسات اخرى قد اجريت على راشح بكتيريا Sh. dysenteriae المنقى جزئياً من السم البروتيني عند حقنه في قطعة معقودة الطرفين من اللفائفي (الجزء الاخير من الامعاء الدقيقة) يسبب تجمع السوائل وتغيرات نسيجية مرضية في الجدار المخاطي للامعاء والتي تماثل الاعراض المتسببة عن اعطاء البكتيريا الحية عن طريق الفم. وعند حقن نفس وجبة التحضيرات الى الفئران يسبب اضراراً في الجهاز العصبي.

ان الجزء البروتيني من السم له وزن جزئيئ 70000 دالتون ويمتلك نشاط سمي ضد الجهاز العصبي ونشاط سمي ضد الخلايا. وان نشاط السم المعوي لهذا البروتين لم تعين ومن المحتمل ان يكون بسبب عدم دقة وحساسية الطريقة المتبعة. ان آلية فعل السم المسبب للاسهال غير معروفة ولكن على الاكثر يعتقد انها مشابهة لآلية فعل سم الكوليرا وتحفيزها لانزيم Adenylate cyclase.

ان دور هذه السموم في المرض لم يحسم بصورة قاطعة ، حيث اوضح عدد من الباحثين ان قابلية بكتيريا Sh. dysenteriae على غزو الانسجة الطلائية لخلايا القولون هو عامل الضراوة أو الفوعة الاولي بالنسبة لهذه الجرثومة حيث لوحظ ان السلالات غير السامة والتي لها القابلية على غزو الخلايا قادرة على احداث الاعراض السريرية المرضية لمرض الـ Shigellosis ، اما السلالات السامة الغير قادرة على غزو الخلايا فتكون غير مضرة للانسان. كما اوضح باحثون آخرون ان عدم التمكن من عزل السموم المعوية عند تنمية البكتيريا بصورة اصطناعية لا يعني عدم قدرة البكتيريا على انتاج هذه السموم داخل الجسم الحي.

على اية حال فإن مرض الـ Shigellosis يتمثل بالاسهال والموت الموضعي للانسجة المخاطية وان Sh. dysenteriae نوع I تحرر السم القادر على توليد هذه الاعراض المرضية مما يشير الى اهمية هذه السموم كعوامل ضراوة أو فوعة بالنسبة لهذه البكتريا

.(Tesh & OBrien, 1991; OBrien, 1992; OBrien, 1998)

جـ- سموم الكلوستريديا Clostridial toxins

9 في هذا الجزء من الفصل سنركز على سموم جنس الكلوستريديا التي لم يتم التطرق اليها سابقاً ، والتي لا تعتبر المحدد الاولي لحدوث المرض وانما لها دور في التعبير عن بعض اعراضه أو ضراوته.

من المعلوم ان جنس الكلوستريديا يضم عدداً كبيراً من الانواع المولدة للسموم والبعض من هذه الانواع لها القدرة على افراز سموم عدة وليس سماً واحداً فقط، وانزيمات خارجية وعوامل اخرى تعرف بالحروف الاغريقية .(Madigan et al., 2002; Todar, 2008)

وسنركز هنا على بعض هذه السموم أو العوامل التي لها اهمية أو دور في توصيف بعض اعراض المرض.

أولاً: بكتيريا الـ Cl. Perfringens نوع C. المسببة لمرض Pigbel في الانسان

هناك عوامل محددة مسؤولة عن توليد المرض وهي : التواجد الدائم لبكتيريا Cl. Perfringens نوع C في التربة وبراز الانسان والخنازير ، ضعف القابلية المناعية المتولدة ضد السموم الموهنة نوع بيتا عند الاطفال الصغار ، المحتوى العالي للكربوهيدرات والمحتوى الواطئ للبروتين في الاغذية المتناولة كذلك الاستهلاك الواسع وبكميات كبيرة للحوم الخنازير وخصوصاً في الاعياد والمناسبات. هذه العوامل مجتمعة تحفز على التكاثر الواسع للبكتيريا في الامعاء والذي يؤدي الى مرض الجانجرين الغازي في الامعاء وبالتالي الوفاة.

ولقد اشار عدد من الباحثين الى ان سم بيتا (β - toxin) هو اهم سم ينتج من قبل بكتيريا Cl. perfringens نوع C والذي يسبب تلف الطبقة المخاطية المبطنة للامعاء وبالتالي يقلل من حركة الشعيرات الزغبية (Villi) مما يساعد على

التصاق البكتيريا بها. ان امتصاص السم من الطبقة المخاطية يؤدي الى الموت الموضعي لجدران الامعاء وبالتالي يؤدي الى الوفاة في معظم الحالات. اما بالنسبة لتأثير الغذاء في حدوث المرض فهو ان المحتوى المنخفض للبروتين يؤدي الى قلة افرازات البنكرياس من الانزيمات المحللة للبروتين ، اضافة الى ان المواد الكربوهيدراتية كالبطاطا مثلاً تحتوي على مواد مانعة لفعل انزيم التربسين (Trypsin) وهذه بدورها تشجع بقاء حيوية السموم نوع بيتا التي تكون حساسة جداً للانزيمات الهاضمة المحللة للبروتينات. ان التمنيع باستخدام سم بيتا الموهن يقلل من نسبة الاصابة بهذا المرض القاتل عند الاطفال.

علماً بان هذا المرض يكاد ان يكون معدوماً في الدول المتقدمة لكنه ينتشر في الدول التي يكون فيها مستوى الصحة العامة منخفض جداً.

ثانياً: بكتيريا Cl. novyi نوع A و B المسببة للجانكرين الغازي في الانسان.

سبق وان ذكرنا بان مرض الجانجرين الغازي في الانسان ممكن ان تسببه انواع مختلفة من بكتيريا الكلوستريديا منفصلة أو مجتمعة.وتشمل Cl. perfringens نوع A ، Cl. novyi نوع A و B ، وكذلك Cl. septicum. وقد شرحنا بالتفصيل دور Cl. perfringens نوع A في هذا المرض.

ان المتيسر من المعلومات عن دور Cl. novyi و Cl. septicum وسمومهما، فيما تسببه في مرض الجانجرين الغازي في الانسان ، فهو قليل جداً. على العكس من ذلك ما هو معروف عن دورهما فيما تسببه من امراض للحيوانات والذي ادى الى استخدام السموم الموهنة بالفورمالين كوسيلة وقائية من هذا المرض. ان مرض الجانجرين الغازي المتسبب عن Cl. novyi يمكن منع حدوثه بواسطة التمنيع باستخدام سم الفا (α toxin) الموهن لنفس البكتيريا أو بحقن مضاد سم الفا مباشرة بعد الاصابة.

ثالثاً: بكتيريا Cl. difficile المسببة لالتهاب غشاء القولون الكاذب في الانسان . Pseudomembranous colitis in man

9

لقد لوحظ حدوث هذا المرض لدى الاشخاص المرضى المعالجين باستخدام المضادات الحياتية بعد اجراء العمليات الجراحية في الامعاء في المستشفيات. ان هذه الظروف تساعد على خلق بيئة تشجع نمو بكتيريا Cl. difficile والتي لا تكون اعتيادياً نشطة في جوف الامعاء لدى الاشخاص الاصحاء . وربما غير موجودة كما ان تحريرها للسم الذي يعتقد بانه مسؤول عن حالة الاسهال والموت لدى المرضى المصابين بها. ويمكن معادلة تأثير السم بمضاد السم المحضر اصلاً ضد سموم بكتيريا الـ Cl. sordelli.

رابعاً: Cl. perfringens نوع B المسببة لمرض الدازنتيري في الحملان Lamb dysentery .

مرض حاد ومميت يصيب الحملان الصغيرة خلال الاسبوع الاول من حياتها وربما في اليوم الثاني أو الثالث ويحدث نتيجة لامتصاص سموم بكتيريا Cl. perfringens نوع B في الامعاء الدقيقة. الصفة المميزة لهذا المرض هو تلف جدار الامعاء والذي يتراوح بين قرحة عميقة بوجود بكتيريا الـ Cl. perfringens نوع B أو سمومها نوع بيتا (β) وابسلون (ε). ان العوامل التي تجعل الحملان معرضة للاصابة غير معروفة كما ان المرض لا يمكن حدوثه من خلال اعطاء راشح البكتيريا عن طريق الفم.

خامساً: بكتيريا Cl. perfringens نوع C المسببة لمرض الضربة (Struck) في الخراف.

يوصف المرض بحدوث تسمم دموي ونزف حاد. المرض يصيب الخراف غير المحصنة ضده. التغيرات المرضية التي ترافق المرض تختلف عن حالات التسمم المعوي المعروفة وذلك بكونها تتصف بالالتهاب المعوي الحاد ، التهاب

الثدي (Abomasititis) ، قرحة في الامعاء الدقيقة مع تقلصات في جدار الامعاء الدقيقة مع تفصد في غشاء جدار البريتون ثم نزف ملحوظ في الاوعية الدموية للبريتون واحياناً تفصد في التجويف الصدري وغشاء القلب.

يكون السم متواجداً في محتويات الامعاء أو في المعدة الرابعة الحقيقية للحيوانات المجترة.

سادساً: بكتيريا الـ Cl. Perfringens نوع D المسببة لمرض التسمم المعوي في الخراف (Enterotoxaemia)

مرض حاد ومميت احياناً يسمى بمرض الكلية اللبُّي. المرض يسبب نزفاً حاداً حول الصمام القلنسي أو التاجي في القلب مع تسرب سوائل الى المنطقة المحيطة بالقلب في الكيس الشغافي. عند الموت يلاحظ ضمور الكلية وتلفها وتكون لينة جداً وعند رفع الكابسول منها يلاحظ تلاشي الطبقة البرانكيمية فيها. ويمكن عزل سم ابسلون (ε) من محتويات الامعاء ، عند التشريح بعد هلاك الحيوان.

سابعاً: بكتيريا Cl. novyi نوع B المسببة للمرض الاسود (Black disease) في الخراف

تسبب التهاب الكبد في الخراف وهو مرض حاد ويتسبب نتيجة لتحرير السم من قبل الخلايا الجرثومية في منطقة الاصابة في الكبد ، وهو دائماً يرتبط بغزو الكبد من قبل الديدان العريضة الغير ناضجة. ويمكن احداث الاصابة تجريبياً في حيوانات خنازير غينيا من خلال اعطاء سبورات Cl. novyi والديدان العريضة معاً. يصيب هذا المرض الماشية احياناً.

ثامناً: بكتيريا Cl. novyi نوع D المسببة لمرض البول الدموي (Red water disease) في الماشية

وهو مرض مميت في الماشية، ومن الاعراض المميزة للمرض اليرقان ،

والنزف الدموي الجلدي، الاستسقاء ثم زيادة في السوائل الصدرية والقلبية مع التهاب معوي مصحوب بنزف دموي شديد والتهاب الغدد اللمفاوية الدموي. يرافق ذلك تضخم في الكبد مع احتشاء في الوريد البابي*.

9 **تاسعاً: بكتيريا الـ Cl. Septicum المسببة لمرض يطلق عليه بالضربة (Braxy in sheep) في الخراف**

وهو مرض مميت وحاد. ان ارتباط هذا المرض ببكتيريا Cl. septicum يعود بسبب ارتباطها بالصفات المميزة للنزف الدموي الحاد في المعدة الرابعة للمجترات. علماً بان المرض لم يتم توليده بصورة تجريبية بحقن بكتيريا الـ Cl. septicum ولكن يمكن منعه بالتمنيع بالسم الموهن المحضر من هذه البكتريا.

عاشراً: بكتيريا الـ Cl. Chauvoei المسببة لمرض الرجل السوداء (Black leg disease) في الخراف والماشية

تسبب مرض الجانجرين الغازي في العضلات والانسجة الرابطة في الماشية والخراف. كما ان هذه البكتيريا هي العامل المسبب لمرض الجانجرين الغازي الذي يحدث اثناء الولادة في الخراف. ان المحفز الاولي لحدوث المرض غير معروف وذلك لكون عملية الاصابة لا ترتبط اطلاقاً بوجود جرح ظاهر للعيان. آن حقن السبورات المغسولة لوحدها لا تسبب المرض ولكن عند إعطائها مع عوامل تسبب تنكز (Necrotizing) للانسجة يحدث المرض.

وبذلك يمكن فهم الحالة على ان السبورات متواجدة بصورة دائمية في العضلات، إلاّ انها لا تسبب المرض إلاّ في حالة تنشيطها من قبل مواد معينة. اما في الخراف فإن الجروح المتكونة اثناء الولادة أو ازالة الخصى أو قص الصوف أو

* Portal vein : الوريد البابي وريد ضخم يحمل الدم من اعضاء الهضم والطحال الى الكبد

التلقيح اضافة الى الاضرار العرضية التي قد تحدث للخراف كلها تساعد على خلق بؤرة للاصابة والتي تتكاثر فيها خلايا هذه البكتيريا.

ان حيوانات خنازير غينيا اقل عرضة أو اصابة من الخراف باستخدام المزرعة الكاملة اوسم البكتيريا فقط ومع ذلك فهي تستخدم كحيوانات تجريبية لتقييم اللقاحات أو الامصال المضادة ضد هذه البكتيريا أو السم كونها اكثر اقتصادية من استخدام الخراف نفسها. ان مثل هذه الفحوصات ضرورية جداً سيما وان سموم بكتيريا الـ Cl. chauvoei نسبياً ضعيفة القتل ، وعلى سبيل المثال سم الفا (α toxin) الذي ينتج كجزء من معقد مستضد دفاعي لكنه بذاته غير مولد للمناعة. ان هذا يجعل عملية فحص معادلة السم من الامور التي يصعب اجراؤها.

عليه فإن من الناحية العملية يجب ان تعتمد اللقاحات على المزروع الكلي للبكتيريا وبالتالي فهي تحتوي على سم موهن للمواد المفروزة خارج الخلية والمواد الخلوية نفسها.

د- سموم المكورات المسبحية المسببة للاحمرار Streptococcal erythrogenic toxins

ان سموم المكورات المسبحية تشترك في توليد الطفح المميز في مرض الحمى القرمزية التي تسببه المكورات المسبحية وعلى اية حال فإن اهمية هذه الظاهرة في اصابات المكورات المسبحية لا تزال مشكوكاً فيها.

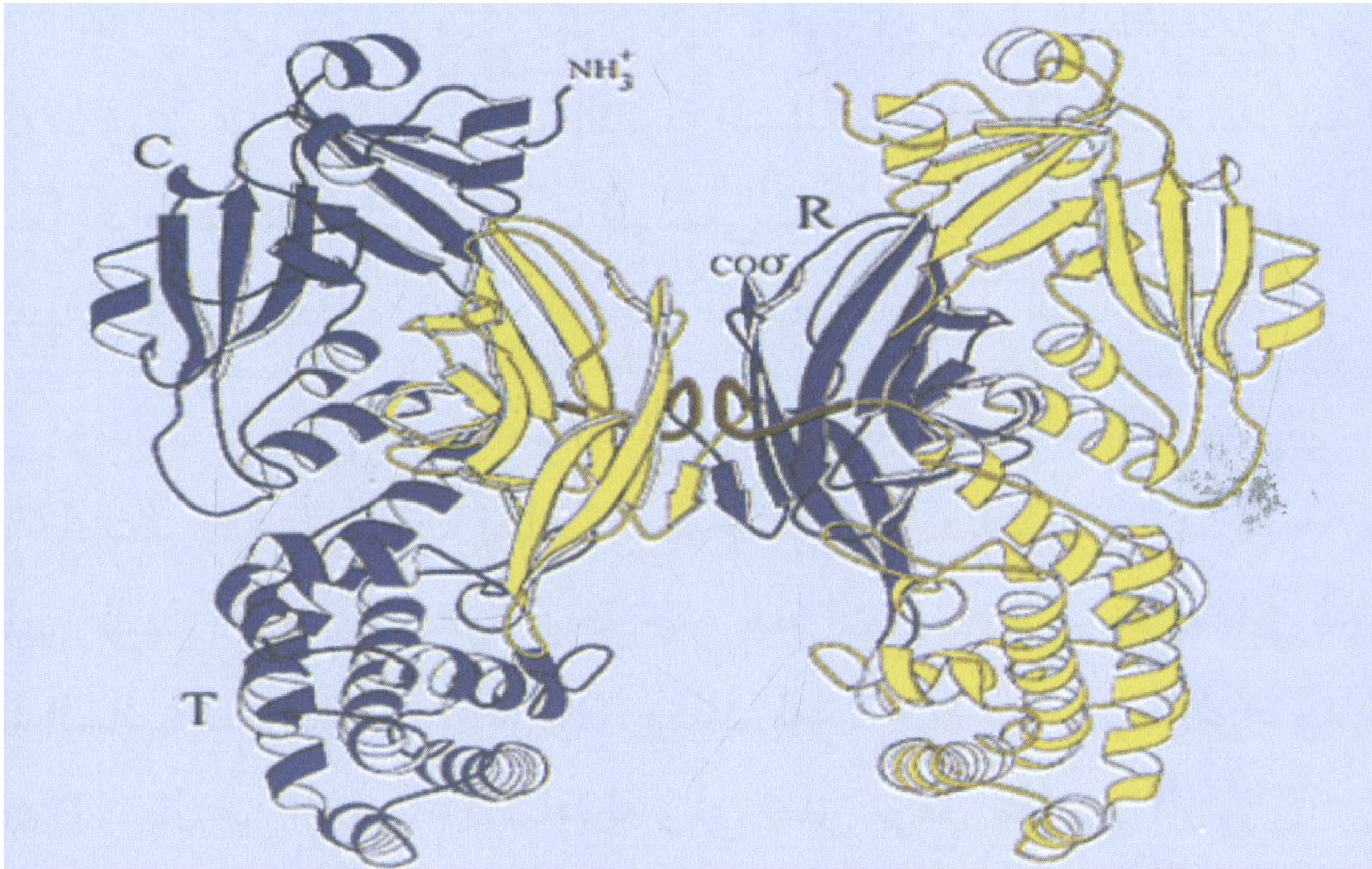
ان السموم المولدة للاحمرار تكون ذات وزن جزيئي واطئ وذات طبيعة بروتينية وتنتج بشكل معقد مع حامض الهايليورونيك الذي يعمل كحامل لها.

يتكون بروتين هذا السم من جزأين:

الجزء الاول الذي يتلف بالحرارة والذي يحدد الخصوصية المناعية والذي يعطي الضروب المصلية A و B و C والذي يكون مسؤولاً عن السمية الاولية ، الحمى ، الهلاكات الضعيفة والتاثير السام للخلايا.

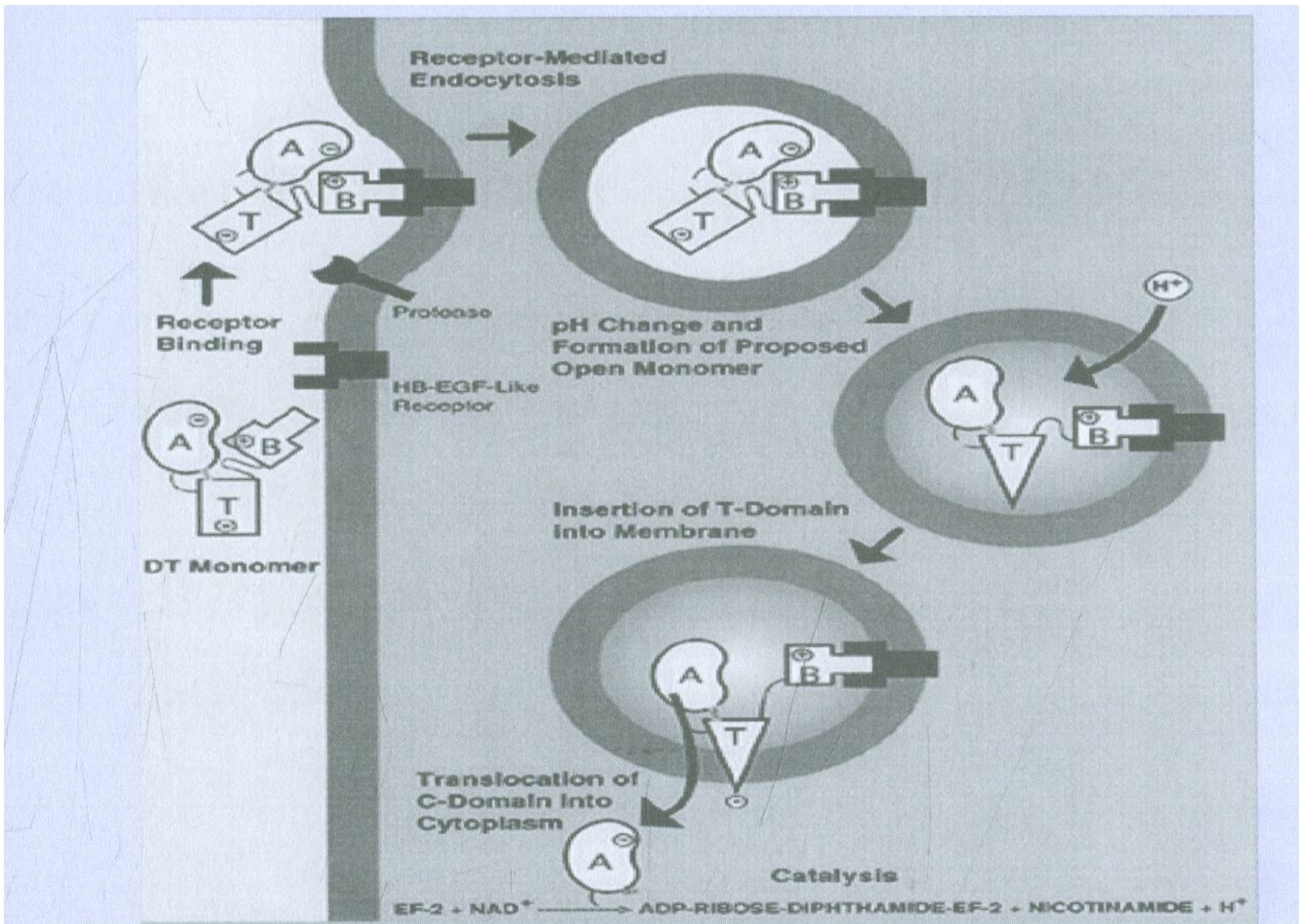
الجزء الثاني من البروتين يكون ثابتاً بالحرارة ويشمل المستضدات A و B و C ومسؤولاً عن احداث السمية الثانوية المتمثلة بتأثيرات الحساسية المفرطة التي تشمل فرط نشاط البشرة ، الموت الموضعي لنسيج القلب العضلي ، تحفيز الحمى ويليها الهلاك. وكذلك تشجيع استجابة المضيف للعوامل الضارة أو المؤذية. 9

وبذلك لا يمكن تحديد النشاط البايولوجية للسموم المسببة للاحمرار بدون الاخذ بنظر الاعتبار الحالة المناعية للمضيف. فمثلاً هناك بعض الاشخاص لا يظهر عليهم احمرار في البشرة نتيجة حقن هذا النوع من السموم كما في فحص دك السالب (Negative Dick test). وذلك لمعادلة هذا السم نتيجة لوجود غيار (Titer) عالٍ من الاجسام المضادة له والتي تغلق موقع التفاعل الاولي .



شكل (1) سم بكتيريا الخناق (سموم الوحدات الفرعية)

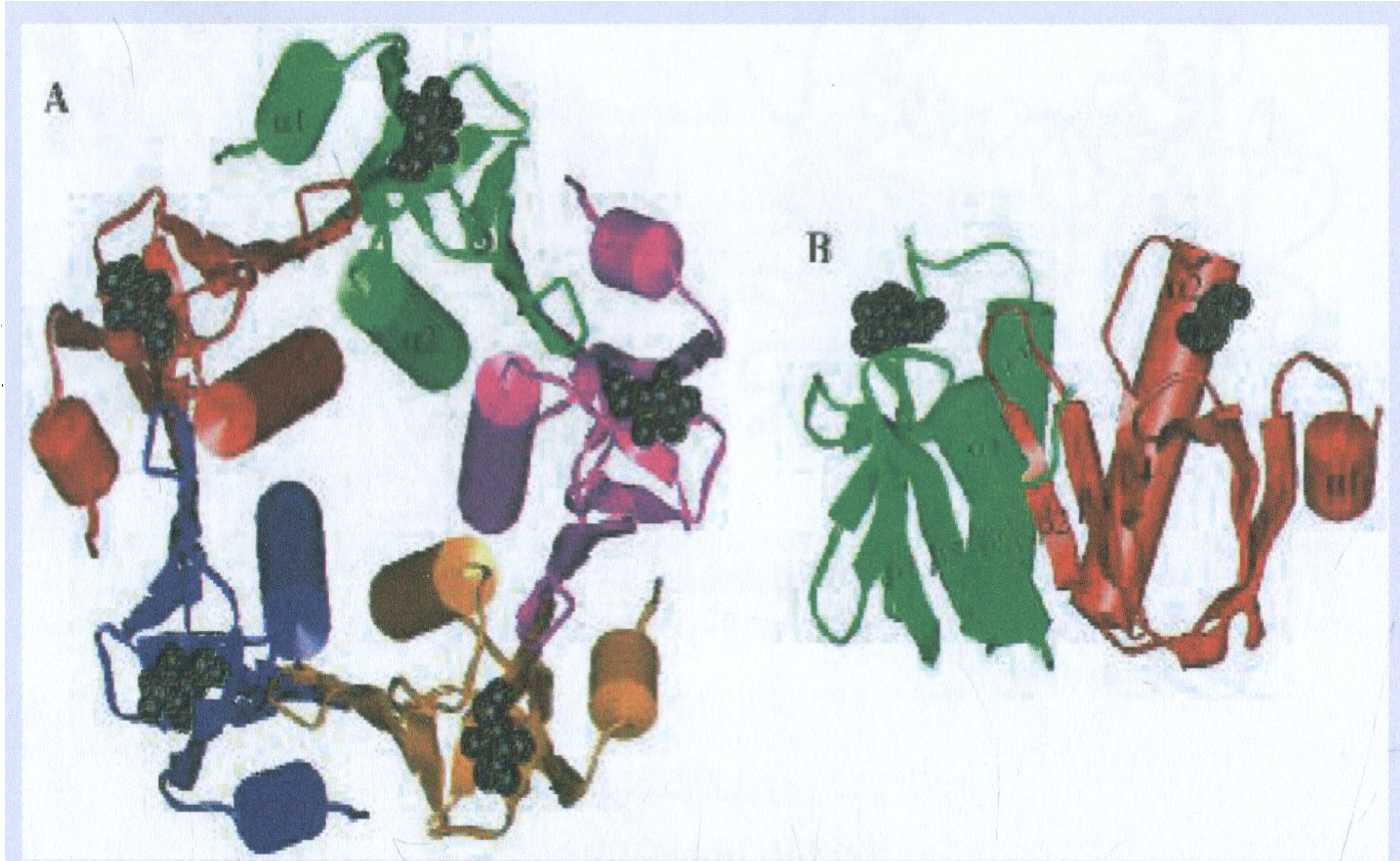
www.ornl.gov./.../publication/berSo/berpdf.html



مخطط يوضح كيفية عمل سم الخناق فى منع تكوين البروتين فى الخلايا الحية

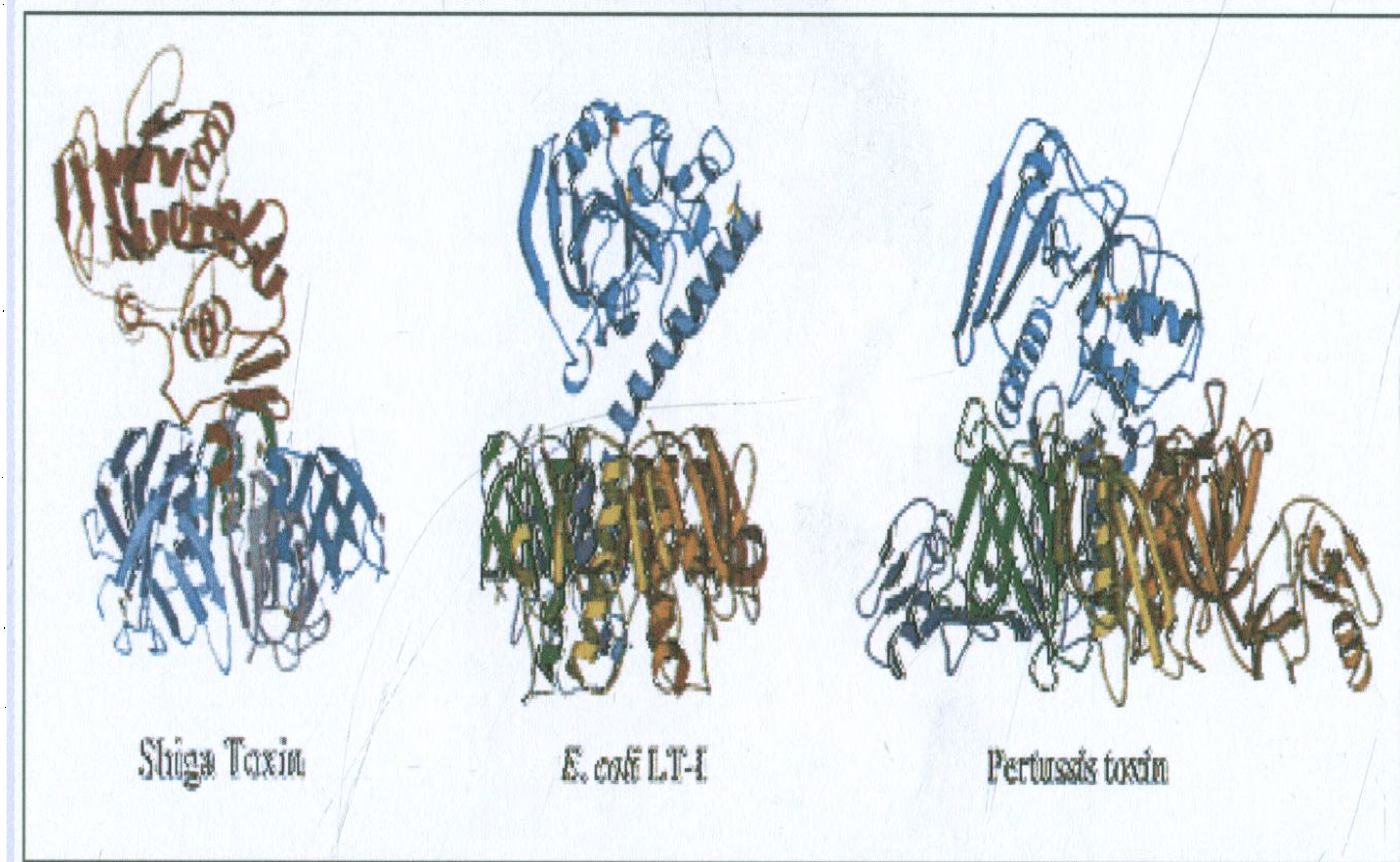
http:/bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/dtox1....

شكل (2)



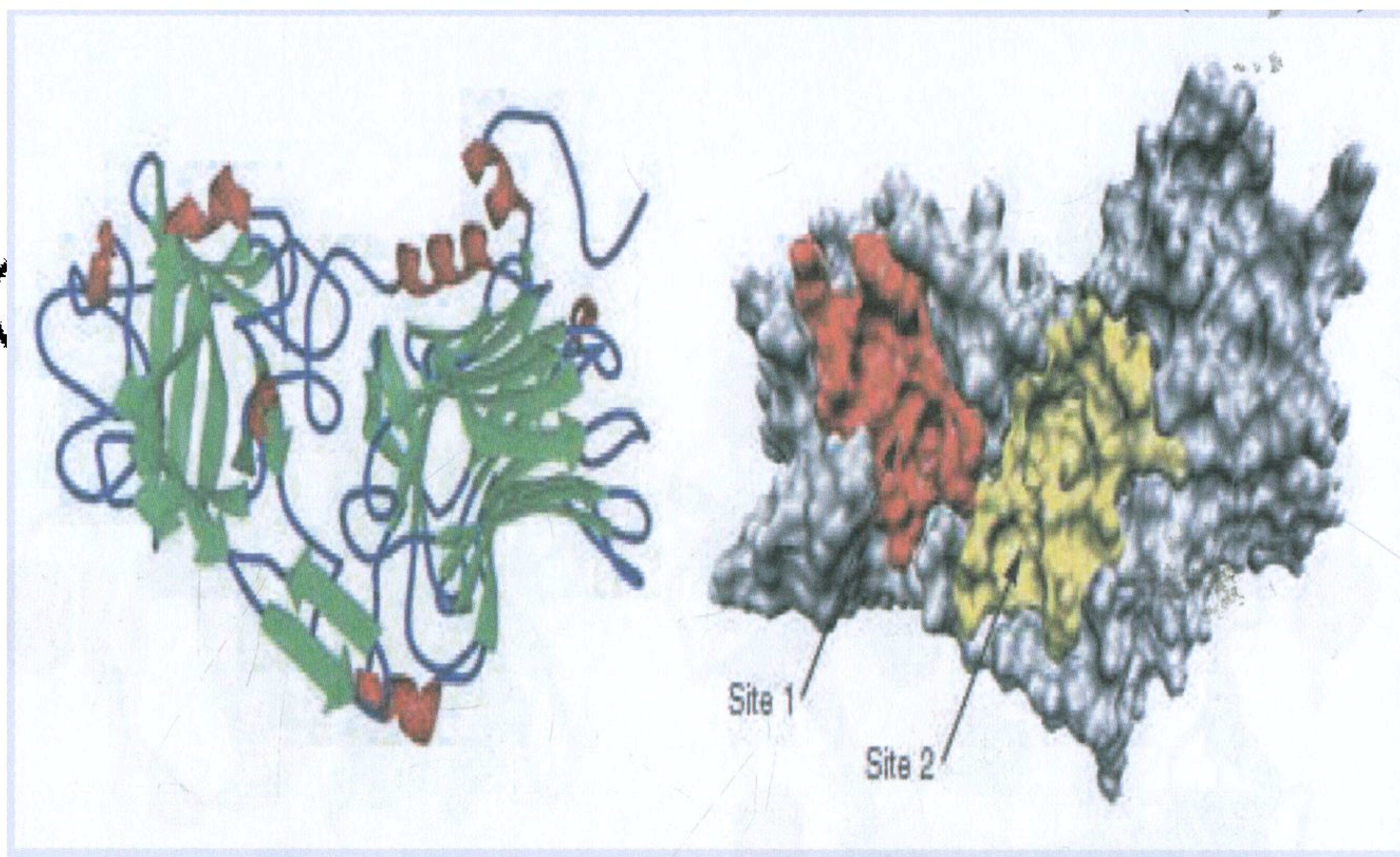
شكل (3) الوحدات الجزيئة لسموم بكتيريا القولون والكوليرا

www.eid.ac.cn

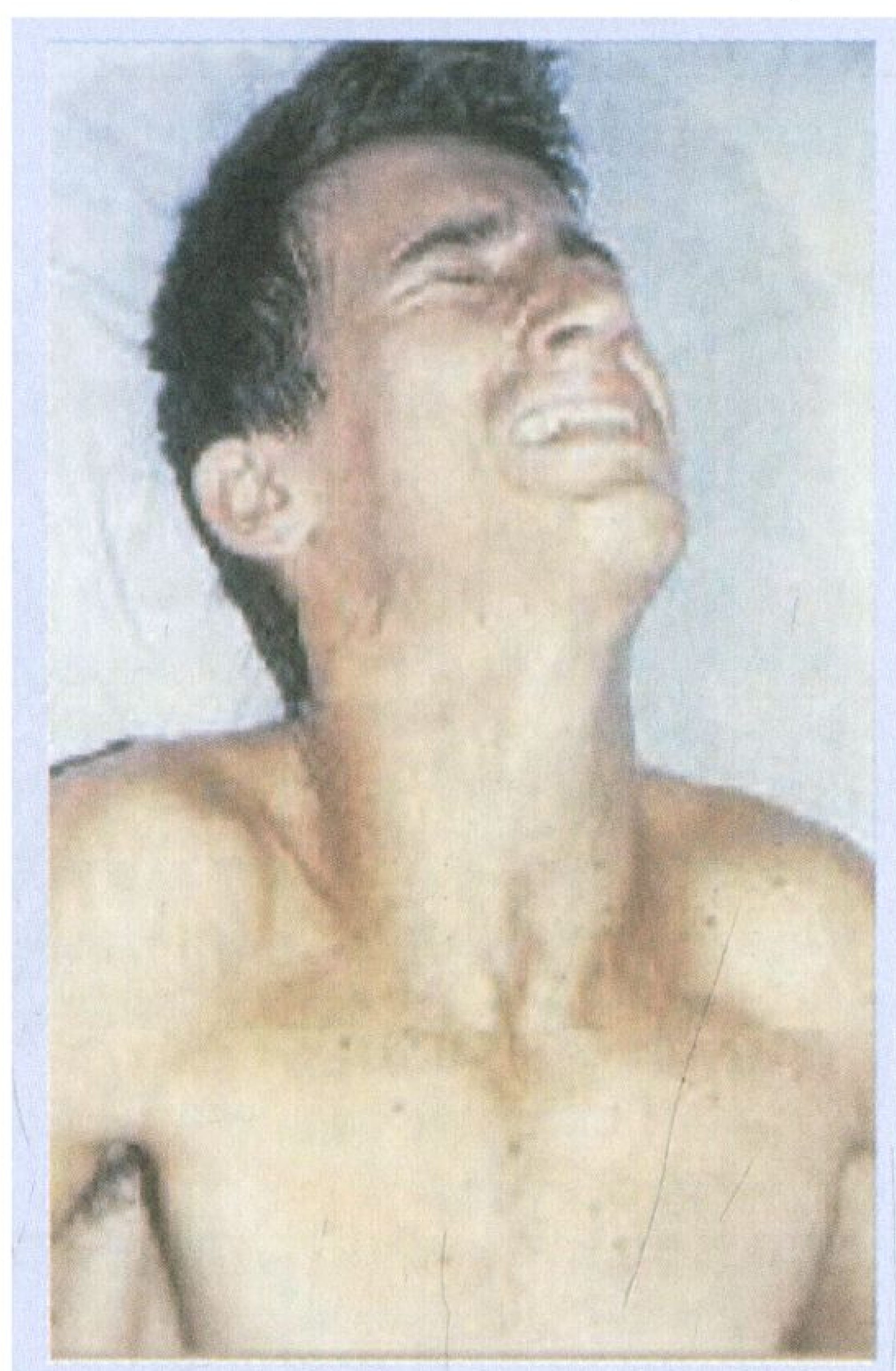


شكل (4) الشكل العام للسموم بكتيريا الشيكلا و بكتيريا القولون المرضية وبكتيريا السعال الديكى

Bacterial toxin : friends or foes

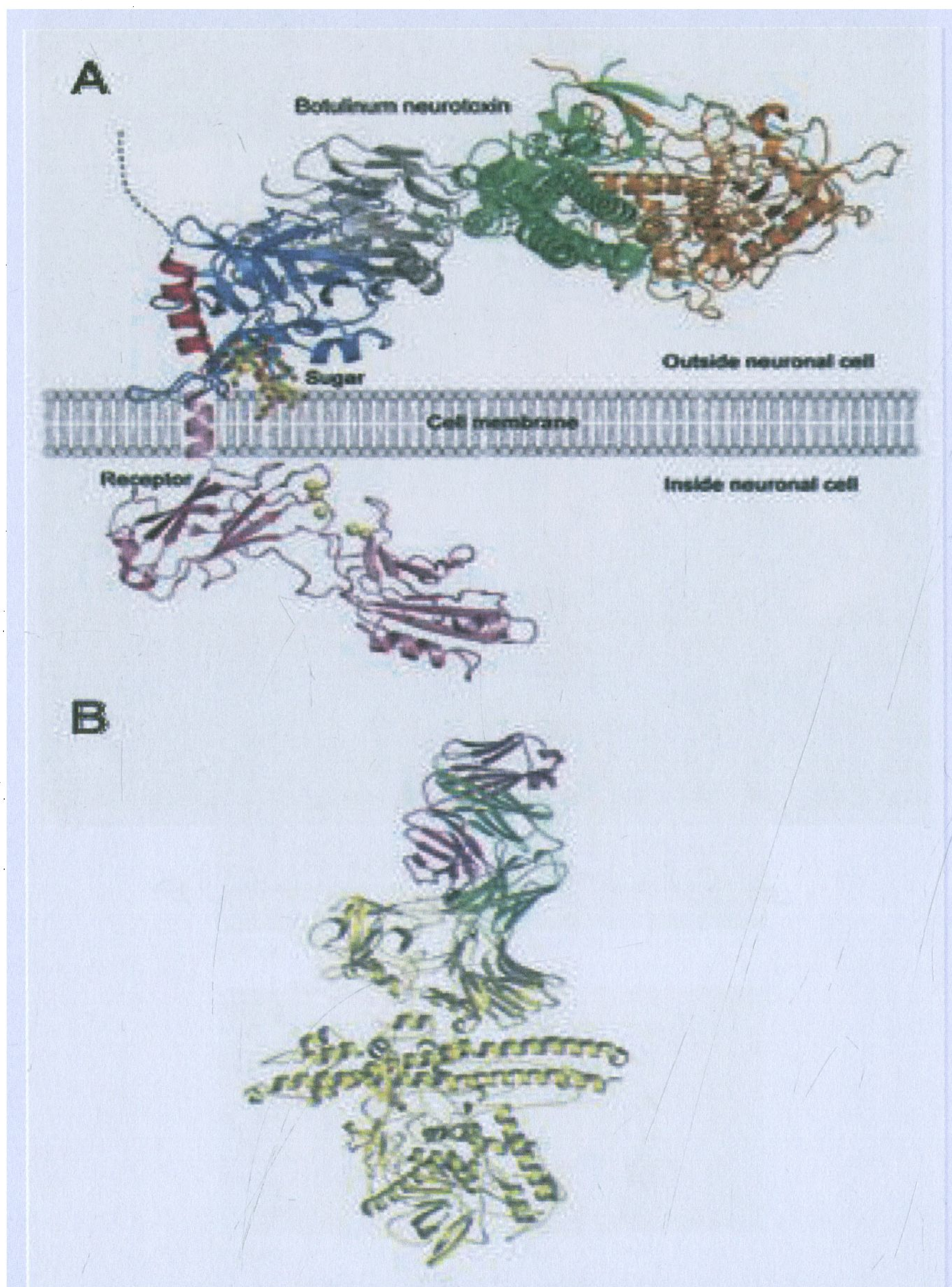


شكل (5) التركيب البلورى لسم الكزاز
S&TR June 2002



تحسس وادراك المصاب بما يلم بة من الآم من جراء اصابتة بمرض الكزاز
Forum.hawaa world.com

شكل (6)



شكل (7) السم البوتيوليني العصبى لاحظ وحدتى السم A& B
Stevens.scripps.edu/botulinum toxin



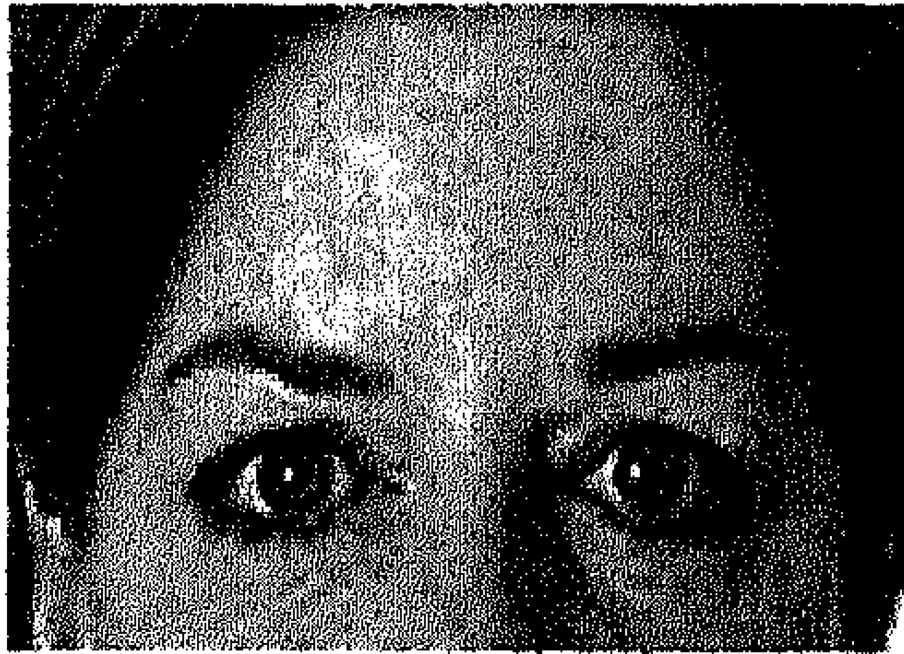
حيوان مصاب بالشلل نتيجة اصابتة بالسم البوتيولينى
شكل (8)

CLICK ON PROCEDURES FOR MORE INFORMATION

BOTOX® Cosmetic

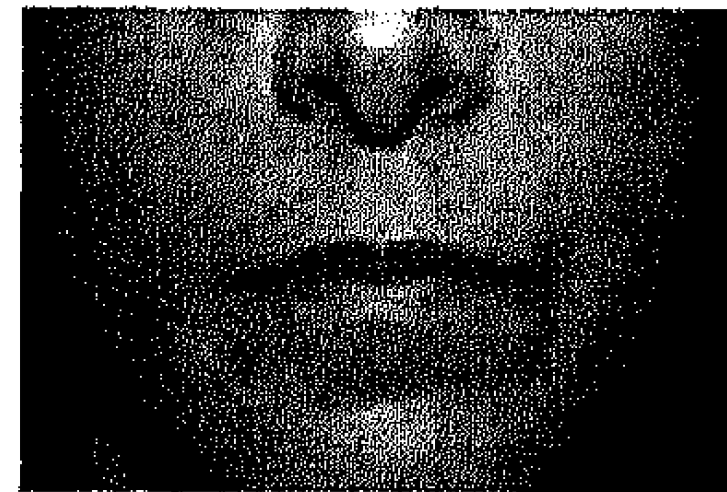



Before

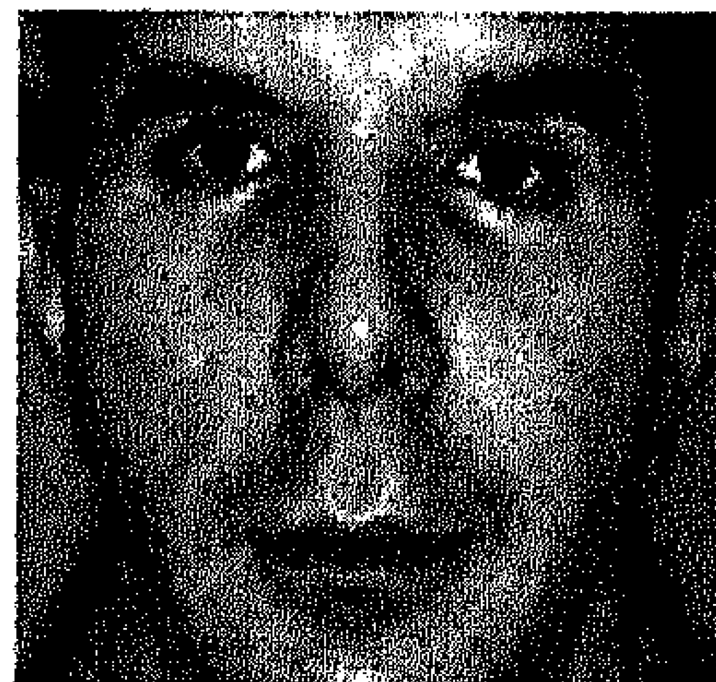



After

Radiesse®

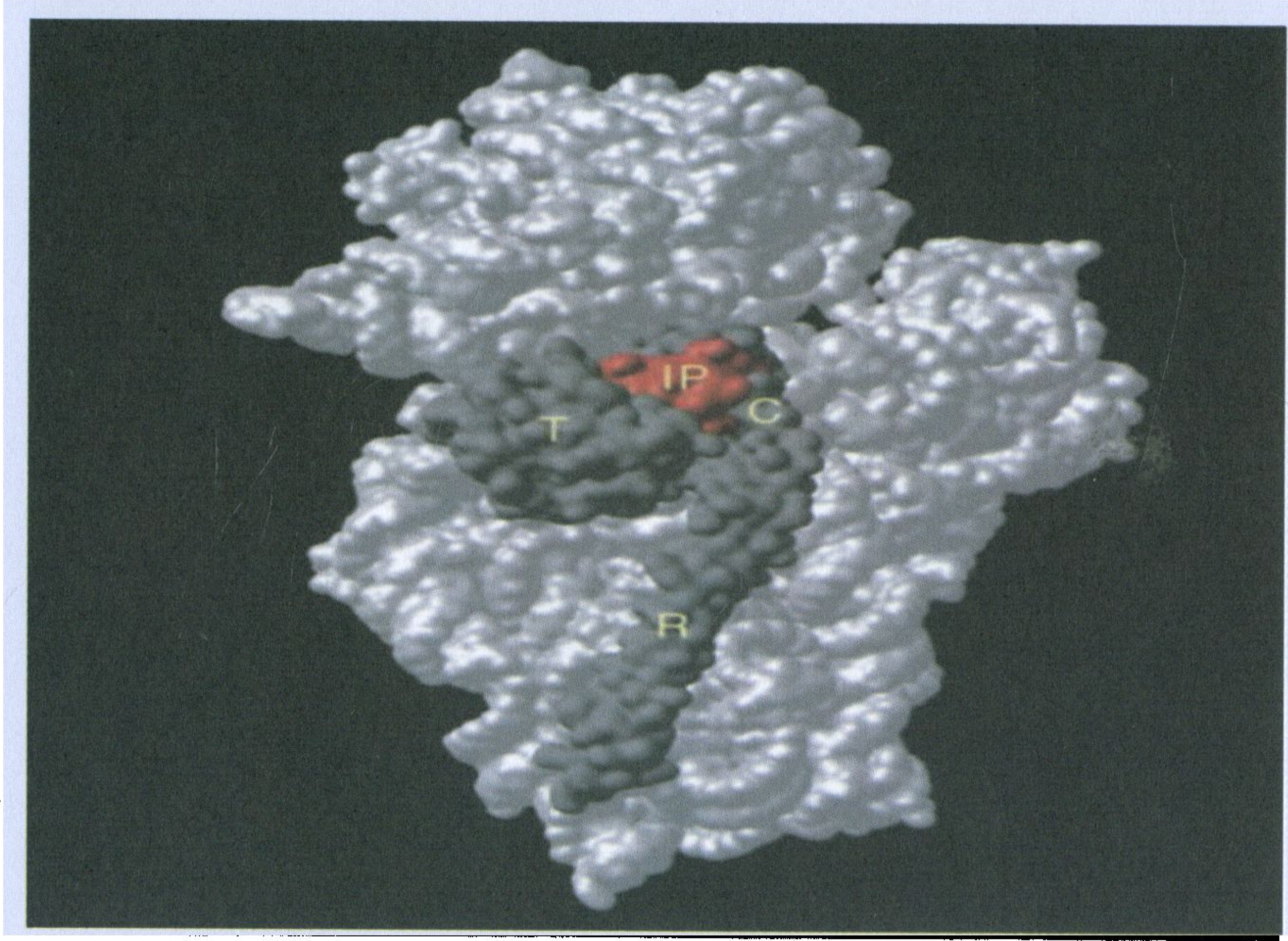
Before After

Before After

شكل (9) استخدام السم البوتيوليني في معالجة بعض حالات الحول اوالحركة غير الطبيعية لعضلات العين وانكماش وتجهم عضلات الوجة

www.hvskin.com/botox radiesse

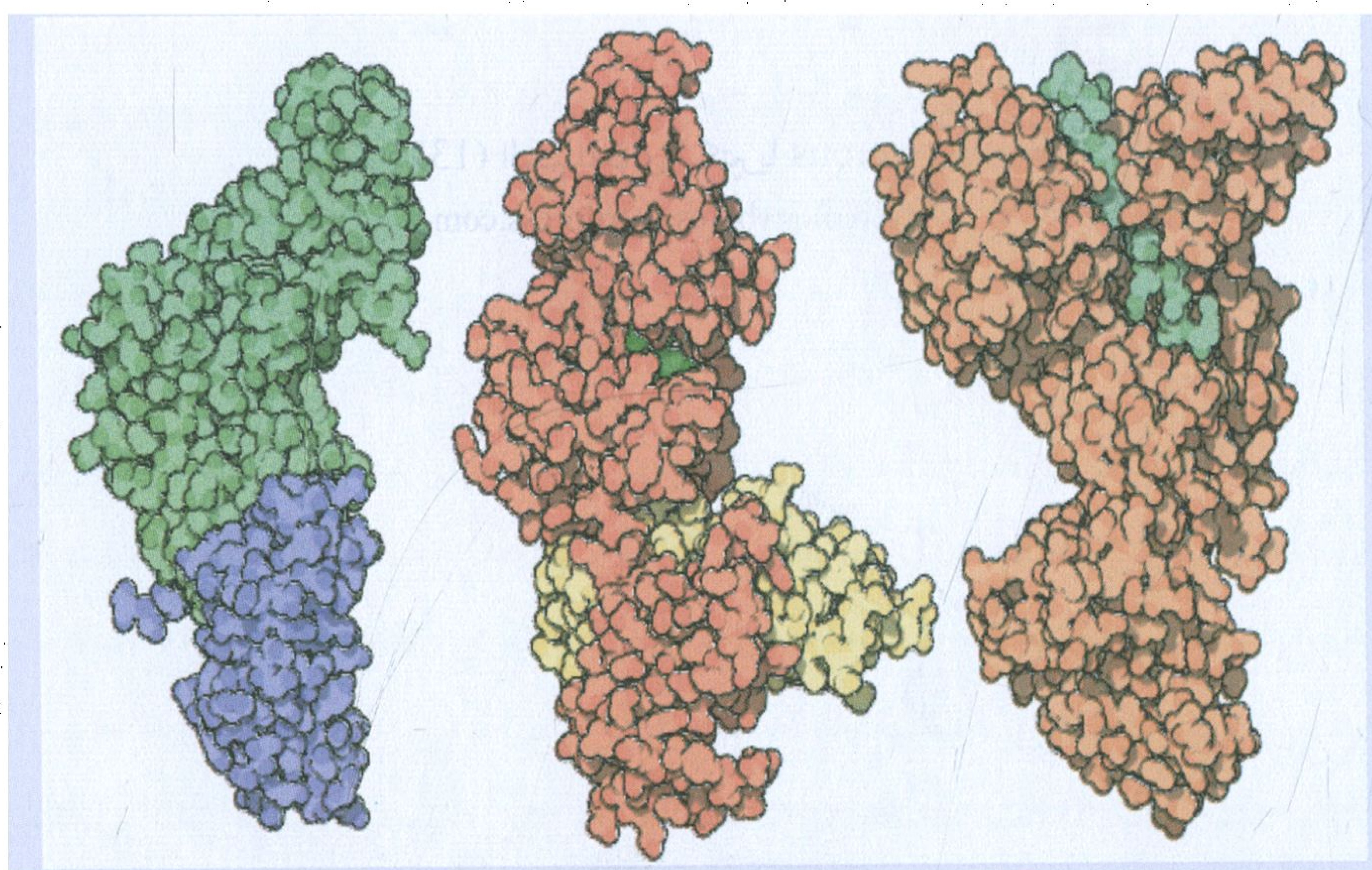


شكل (10) الهيئة العامة للكوليسين E3

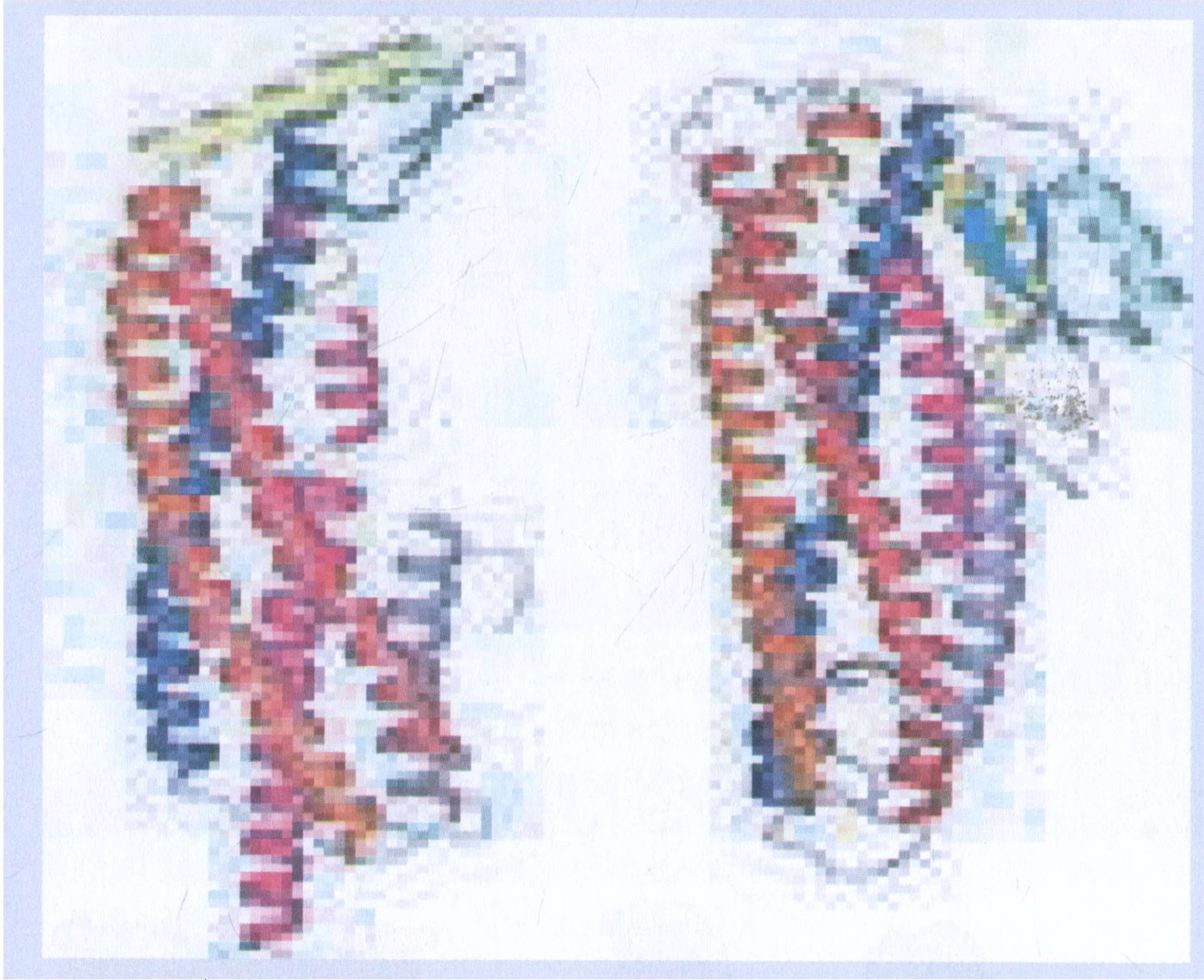
www.cwru.edu/med



مرض الكانكرين الغازى الناتج عن الاصابة ببكتيريا *Clostridium perfringens*
وتكوينها للسم الانزيمى collagenase
Dictionary.thefree dictionary.com
شكل (11)



شكل (12) المكونات الثلاث لسم الجمرة الخبيثة (Anthrax toxin)
Upload.wikimedia.org



شكل (13) السم المعوى لبكتيريا Bacillus cereus
Microbiologybytes.wordpress.com

10

الفصل العاشر
السموم البكتيرية الداخلية
Bacterial Endotoxin

1. مقدمة
Introduction

السموم الداخلية (Endotoxins) أو الذيفانات الداخلية أو السموم الداخلية المنشأ هي مجموعة من السموم البكتيرية التي تتميز بصورة واضحة كيمياوياً عن السموم البروتينية الخارجية (Exotoxins) .

ترتبط هذه السموم بصورة ثابتة ببكتيريا السالبة لجرام (Gram negative bacteria) مع ان قسماً من بكتيريا السالبة لجرام تكون السموم الداخلية والسموم الخارجية، كما هي الحالة، في بكتيريا القولون المعوية المرضية (Entero pathogenic E. coli) حيث تكون السم المعوي الخارجي (Exotoxin) Enterotoxin إضافة إلى السم الداخلي الذي يتصف بالصفات العامة للسموم الداخلية للبكتيريا. إن العالق البكتيري المقتول، للأنواع المرضية وغير المرضية لبكتيريا السالبة لجرام يكون له تأثيرٌ سميّ على الإنسان والحيوان عند حقنه بهذا العالق. وهناك مواد لها تأثير مَرَضي فسلجي مشابه التأثير على المضيف يمكن فصلها أو عزلها من راشح النمو البكتيري القديم (لبكتيريا السالبة لجرام) أما بواسطة الغلي أو بطرق الاستخلاص البسيطة المعروفة كاستخدام

محلول مركز لملح الطعام أو سترات الصوديوم أو محلول الفينـول المـائي. وعليـه ولهذه الأسباب فان السموم الداخلية تعتبر جزءاً من المكونـات التركيبيـة لخلايـا البكتيريا والتي يمكن تحريرها إما بواسطة تحلل الخلايـا أو بواسـطة التحلـل عـن طريق تحطيم الخلايا أو هضمها ولذلك وصفت بالمصطلح السم الداخلي.

ان استخدام مصطلح السم الداخلي يعود إلى عام 1892م عندما اسـتخدم لأول مرة من قبل العالم Pfeiffer ولحينه يعتبر اسـتخدامه في التـسمية مفيـداً ولم يظهر مصطلح مرادف مقبول آخر يمكن استخدامه في التسمية.

ان تحرر السم الـداخلي يعتمـد علـى التحلـل الـذاتي للخلايـا عليـه فقـد تمكـن الباحثون الأوائل في هذا المجال، من جمع السم الداخلي من المـزروع البكـتيري القـديم. ولقد بُـرهن بـان المستـضدات الانتيجينـات الجـسمية (O-somatic antigen) لبكتيريـا السالبة لجرام هي جـزء مـن التركيـب الجزيئـي المعقـد الـذي يظهـر الفعاليـة الـسمية الداخلية. ان فصل مادة جدار الخلية من الغشاء السايتوبلازمي تظهر الجزء الأكـبر مـن السم الداخلي الموجود في هذه المادة وضمن هذا التركيب. وبناءاً على ذلك فـان تحريـر السم الداخلي لا يعني بالضرورة تحلل الخلايا، تحلل ذاتي فقط، بـل يمكـن تحريـره مـن الخلايـا الـسليمة (Intact cells) دون إحـداث أي تغـير تـركيبي ملحـوظ بغـلاف (Envelope) الخلية، كما أظهره المجهر الضوئي والالكتروني . وبذلك فان تحرير الـسم الداخلي يمكن ان يحدث ، بكميات كبيرة من خلايا البكتيريـا الـسليمة والناميـة. تـشير السموم الداخلية بالتحديد إلى مـادة متعـددة الـسكريات الـدهني lipopolysaccharide (LPS) الذي يقع في الغشاء الخارجي للبكتيريا السالبة لجرام، كذلك يمكـن أن يحـرر أو يطلق، السم الداخلي المذاب، من البكتيريا النامية أو خلايا البكتيريا التي تتحلـل نتيجـة للوسائل الدفاعية للمضيف أو نتيجة استخدام المضادات الحيوية (Todar, 2008).

2. الطبيعة الكيميائية للسموم البكتيرية الداخلية
The Chemical Nature of Endotoxin

10 تتكون السموم الداخلية كيميائياً من معقدات الدهون العديدة التسكر (Lipopoly saccharides) الخالية من البروتينات إلا أنها كثيراً ما تتكون من معقدات جزيئات عديدة التسكر الغير الأساسية، مكونات دهنية، متعدد البتيدات والايونات المعدنية حيث يرتبط وجود أو عدم وجود هذه المكونات بطريقة تنمية الكائن الحي وطريقة استخلاص هذه السموم. تشير البحوث الحديثة عن التركيب الكيميائي لغلاف خلايا بكتيريا السالبة لجرام إلى إمكانية وجود علاقة بين طبيعة مادة الدهون العديدة التسكر وبين وظيفة هذه الأغلفة أو الأغشية ان معظم البحوث المتعلقة بالسموم الداخلية قد أجريت على بكتيريا جنس السالمونيلا *Salmonella*. ان الانتيجينات (المستضدات) الجسمية النوعية (O-specific antigens) لخلايا المستعمرات الملساء تكون واقعة أو متواجدة على سطح الخلية حيث تتكون من جزيئات كبيرة معقدة هي جزيئات العديدة التسكر والدهنيات والتي ترتبط بمادة ميوكوببتايد (Mucopeptide) لجدار الخلية. ان مادة الدهنيات العديدة التسكر سلاسل طويلة من فوسفات البوليمرات المختلفة والتي تتكون من ثلاثة مناطق متميزة والمعروفة بـ I, II, III (شكل 10-1).

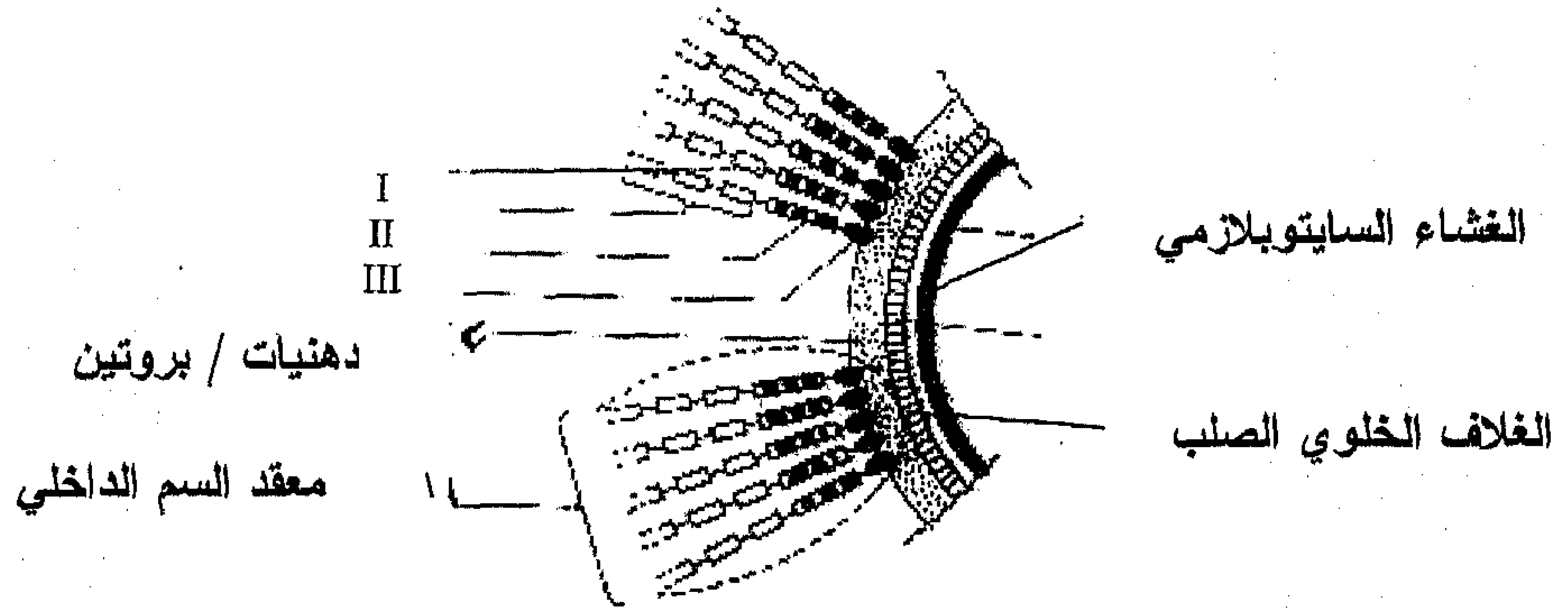
المنطقة I (Region I) وتتكون من وحدات سكرية متكررة تحتوي على من 2-6 جزيئات من السكريات البسيطة وتسمى بـ (Oligosaccharides). وتحتوي هذه المنطقة على سكريات متخصصة في التركيب خصوصاً النهائية أو الطرفية والتي تؤكد الخصوصية المناعية للمستضد الجسمي المعين كما تظهر صفة

النعومة (Smoothness) أو كون مستعمرات السلالة أو العترة ملساء. ان فقدان هذه المنطقة (I) يؤدي إلى تغير مظهر السلالة إلى الخشنة (Rough).

المنطقة II (Region II) والتي تؤلف اللب (Core) أو الجزء المركزي في التركيب والذي مع اختلافات طفيفة يكون مشتركاً لكل وحدات الدهنيات العديدة التسكر لأنواع بكتيريا السالمونيلا والذي يختلف من حيث التركيب في أجناس أخرى من بكتيريا السالبة لجرام . في السلالات الخشنة يشغل اللب موقع طرفي لوحدات الدهنيات العديدة التسكر ويختلف من حيث التعقيد حسب نوع السلالة ويتراوح من النوع المعقد جداً (الأقل الخشونة) إلى النوع البسيط جداً (الأكثر خشونة). وهناك على الأقل أنماط كيميائية مختلفة تمثل مقدار التدرج في التعقيد في تركيب هذا الجزء وذلك بفقدان متتالٍ للجزيئات التالية : N استيل جلوكوز أمين، الجلوكوز، الجالاكتوز والجلايسين.

المنطقة III (Region III) والتي تتكون من المادة الدهنية حيث ترتبط الجزيئات الكبيرة لمادة الدهنيات العديدة التسكر وبين البروتين المرتبط بالخلية. الصفات المميزة للسم الداخلي ترتبط بهذه المنطقة.

وهناك نوعان من المادة الدهنية تتميز بها هذه المنطقة هي المادة الدهنية (A) حيث ترتبط هذه المادة بقوة بمادة عديدة التسكر وهي المسؤولة عن فعالية السم الداخلي أو ما يسمى بالسمية الداخلية (Endotoxicity) ، وهذه تتكون من بوليمرات 1.6 بيتا المفسفرة المرتبطة بمادة جلوكوز أمين ثنائية التسكر. أما المادة الدهنية (B) فيمكن فصلها أو انتزاعها بسهولة من هذه المنطقة وتكون خاملة بيولوجياً.



شكل 10-1 : مخطط يمثل جزء تركيب الجدار الخلوى لبكتيريا السلبة لجرام النموذجية. المنطقة I الوحدات النوعية الجسمية O المتكونة من 2-6 جزيئات من السكريات البسيطة. المنطقة II التي تشكل اللب أو الجزء المركزي في التركيب. المنطقة III المادة الدهنية (Linton, 1986).

ان الصفات المميزة للمادة الدهنية (A) وعلاقتها بالسمية (Toxicity) قد وضحت من خلال دراسة المستعمرات الخشنة لبكتيريا الـ Salmonella minnesota المطفرة. ففي هذه البكتيريا وجد أن مادة الدهنيات العديدة التسكر الحاوية على المادة الدهنية (A) وليس المادة الدهنية (B)، والحاوية على سكر 2 كيتو-3-داي اوكسي حامض الجلوكونيك المرمز (KDO) (2-Keto-3-dioxy cloconic acid) ان معظم الصفات المميزة البيولوجية للسم الداخلي يعبر عنها هذا التركيب. كما إن إزالة مادة (KDO) بواسطة عملية تحلل مائي معتدلة أو خفيفة والتي ينتج عنها ناتج خالٍ من المادة الدهنية (A) تظهر فعالية داخلية قليلة جداً إلى معدومة، مما يشير إلى أهمية سكر (KDO) للتعبير عن السمية. وعلى أية حال فإن ارتباط المادة الدهنية (A) الحرة بمادة بروتينية من أصل غير بكتيري كأن يكون البومين المصل البقري (Bovine serum albumine) فان المعقد الناتج يظهر الصفات المميزة الفعالة للسم الداخلي. وعليه فان الشواهد

تشير إلى ان الجزيئات العديدة التسكر والأجزاء البروتينية لهذه المعقدات هي ليست أساسية لإظهار السمية بل هي عوامل مساعدة أو إضافية للتعبير عنها.

ان الجزيئات العديدة التسكر الداخلية في تركيب مادة، الدهنيات العديدة التسكر، ومادة (KDO) تعمل كمواد ذائبة في الماء لنقل المادة الدهنية A الغير الذائبة فيه. ان تركيب جزيئات العديدة التسكر يؤثر تأثيراً كبيراً على قابلية ربط جزيئات الماء بسطح الخلية وان الجزيئات العديدة التسكر المتفرعة ترتبط بها كمية كبيرة جداً من الماء. ان السلالات الخشنة الفاقدة لمادة عديدة التسكر قابلية ضعيفة جداً لربط الماء بسطح الخلية وهذا ما يفسر ظاهرة التلازن الذاتي (Spontaneous agglutination) التي تتميز بها هذه السلالات.

حدة الامراضية أو شدة المرض (الفوعة Virulence) وصفة النعومة يرتبطان بالمنطقة رقم I حيث تكون موجودة في كل إصابات بكتيريا السالبة لجرام . من جهة أخرى المادة الدهنية (A) والتي تمثل التركيب الفعال بيولوجياً للسم الداخلي تكون موجودة في السلالات الناعمة والخشنة على حدٍ سواء. عليه فان حدة الامراضية (الفوعة) لا تعتمد على وجود المادة الدهنية (A) لوحدها بل تحتاج إلى وجود المنطقة I بأكملها. ان المستضدات (الانتيجينات) الناعمة ربما تساعد الكائن الحي الممرض على الالتصاق بنسيج البلعوم أو مقاومة الخلايا الملتهمة للأجسام الغريبة وعكس ذلك السلالات الخشنة التي تستسلم للخلايا الملتهمة لها.

3. الخواص الفيزيائية. Physical properties

السموم الداخلية تكون ثابتة عند تعرضها للحرارة (Heat stable) وهذه الصفة أو الخاصية الفيزيائية هي التي تميز السموم الداخلية عن كل السموم

الإحيائية. على سبيل المثال السم الداخلي المشتق من بكتيريا جنس Pseudomonas spp يفقد فعاليته عند تعرضه للحرارة بجهاز التعقيم الموصدة أو المعقم (Autoclave) لمدة سبع ساعات بدرجة126م° ولكن تعرضه لمدة 30 دقيقة لدرجة حرارة 145م° لا تفقده من فعاليته شيئاً. كما ان رفع أو خفض 10 درجة الحموضة تقلل من تحطيم السم بواسطة الحرارة الرطبة. وتؤثر العوامل المؤكسدة كالبرمنكنات، والداي كرومات، والهايبوكلورايت وبيروكسيد الهيدروجين في تحطيم السموم الداخلية. وعلى أية حال فانه من غير الممكن استخدام مثل هذه المواد للقضاء على السموم الداخلية في المحاليل الطبية كمحلول سكر الجلوكوز المستخدم في الحقن الوريدي، ولابد من ضرورة استبعاد أي نموذج يشك بتلوثه بالسموم الداخلية. كما يجب ان تكون إجراءات الوقاية محكمة جداً عند التعامل مع المواد الداخلة في الصناعات الصيدلانية للاستخدام البشري أو الحيواني وإيجاد وسائل سيطرة نوعية وفحص دقيقة جداً للتأكد من سلامة المواد من السموم الداخلية.

هناك تقنية محدودة التداول لإزالة السموم الداخلية إما باستخدام طريقة المرشحات الغشائية الفائقة الدقة (Ultra filtration) أو بطريقة الامتصاص .(Absorption)

4. الخواص البيولوجية. Biological properties

عند مقارنة السموم الداخلية البكتيرية بالسموم الخارجية البكتيرية نجد ان السموم الداخلية اقل فعالية (Potency) من السموم الخارجية. والسموم الداخلية هي عبارة عن مستضدات (انتيجينات) إلاّ أنها قلما تُكوّن استجابة مناعية في الحيوان كافية لإعطاء حماية أثناء إجراء اختبار التحدي المناعي لهذه

السموم. كما لا يمكن تحويل هذه السموم إلى سموم مضعفة (Toxid)* وبغض النظر عن نوع المصدر البكتيري فان جميع السموم الداخلية تولد نفس الفعل أو التأثير البيولوجي في المضيف. من أهم الأعراض المرضية الناتجة عن السموم الداخلية والتي تظهر بعد ساعات قليلة من حقن السم هي الإسهال، الإعياء وتشنجات سابقة للموت (Antemortem convulsions) وغالباً ما تكون الأعراض مشابهة لإعراض الصدمة الثانوية الناتجة عن عجز جهاز الدوران المحيطي. ومن أهم الأعراض الظاهرة عند فحص الجثة بعد الوفاة هي الاحتقان، الاستسقاء (Odema) ونزف دموي في البلعوم وأحشاء البطن والرئة.

ان معرفتنا بالنشاطات البيولوجية للسموم الداخلية هي ليست من دراسة الأمراض الطبيعية الناتجة عن هذه السموم بل من نتائج اختبارات التحدي المناعي (Challenge) التي تجري على حيوانات التجارب، ويكون التأثير اكثر وضوحاً عند حقن الحيوان المضيف بالسم الداخلي. وهناك شواهد قليلة تشير إلى ان السموم الداخلية تمتص من خلال جدار البلعوم بعد تناولها عن طريق الفم. كما تشير بعض التقارير إلى ان تناول أعداد كبيرة من بكتيريا Aerobacter aerogenes عن طريق الفم تسبب الإسهال والغثيان. كذلك من المحتمل امتصاص السموم الداخلية عن طريق الجهاز التنفسي بعد استنشاق رذاذ (Aerosol) السموم الداخلية والذي يسبب التهاب الرئة.

ولعل من أهم استجابات المضيف الرئيسية في الحيوانات للسموم الداخلية هي:

* Toxoid: السم الذي عومل بحيث احتفظ بقابليته المستضد الانتيجينية ولكن أزيلت منه قابليته السمية.

أ- الموت أو الهلاك Lethality.

إن إعطاء جرع كبيرة من السم الداخلي مأخوذة عن طريق المريء أو الأمعاء تسبب الموت أو الهلاك في معظم اللبائن. هناك مراحل متعاقبة تحدث بعد اخذ السم الداخلي وتشمل آلام تحدث بعدة فترة الحضانة وتشمل الإسهال، الإعياء، والتي تؤدي إلى الموت، كما أن سرعة حدوث الهلاك تعتمد جزئياً على مقدار الجرعة والاهم من ذلك نوع الحيوان، فمثلاً الأرانب أكثر حساسية للتعرض للسم الداخلي من الفئران وبمقدار 1000 مرة. ومن العوامل الأخرى المؤثرة على حساسية أو استجابة الحيوانات للسموم الداخلية هي الاختلافات الوراثية بين السلالات المختلفة للحيوانات وكذلك عمر الحيوانات. ففي بعض أنواع الحيوانات تكون الحيوانات الكبيرة البالغة (Mature) أكثر حساسية من الحيوانات الصغيرة، والعكس صحيح. فمثلاً الأرانب البالغة أكثر استجابة أو حساسية للسموم الداخلية من الأرانب الصغيرة، في حين حيوانات خنازير غينيا والدجاج تكون استجابة الحيوانات الصغيرة منها للسموم الداخلية أكثر من استجابة الحيوانات الكبيرة أو البالغة. وفي بعض أنواع الحيوانات تكون حساسيتها للاستجابة للسموم الداخلية معتمدة على التعرض إلى بكتيريا السالبة لجرام الموجودة بصورة طبيعية في الأمعاء. فالحيوانات الخالية من بكتيريا السالبة لجرام تكون أكثر مقاومة للسموم الداخلية من الحيوانات النامية بصورة اعتيادية أو تقليدية، والحيوانات الحاوية على أعداد كبيرة من بكتيريا السالبة لجرام والنامية بصورة طبيعية في جدار البلعوم لهذه الحيوانات تكون أكثر حساسيةً للسموم الداخلية من تلك الحاوية على أعداد قليلة منها. هذه الملاحظات تشير إلى أن التعرض المسبق لبكتيريا السالبة لجرام يزيد من حساسية الاستجابة للسموم الداخلية. وأحيانا من الممكن ان يحصل تأثير معاكس حيث تزداد أو

تحفز المقاومة أو قابلية التحمل، في الحيوانات المعرضة بصورة طبيعية للإصابة بهذه السموم من خلال التعرض المتكرر أو المتعمد للسموم الداخلية.

ان هلاك الحيوانات نتيجة تعرضها للسموم الداخلية تختلف باختلاف طريقة اخذ السم الداخلي، ففي الأرانب تكون قابلية التعرض للهلاك بهذه السموم حسب الترتيب التالي لأخذ السم: طريقة الجلد، طريقة الغشاء البريتوني (خلب) وأخيرا عن طريق الوريد. أما في الفئران فان العمر وطريقة اخذ السم له تأثير ضئيل على ذلك.

ب- توليد الحمى Pyrogenicity.

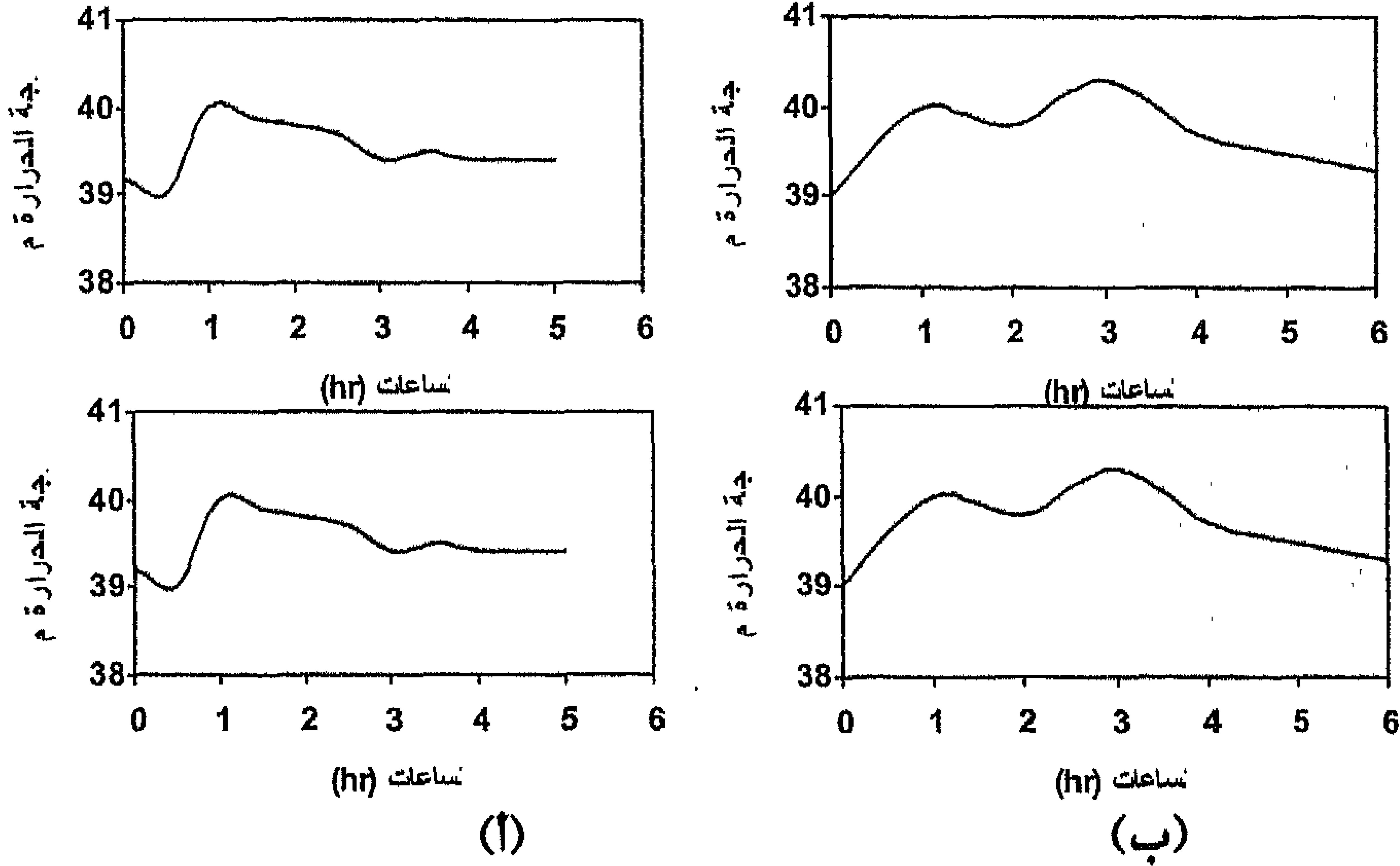
لقد استخدم مصطلح مولد الحمى (Pyrogen) منذ عام 1875م لوصف أي مادة لها القابلية على توليد الحمى إلا انه كمصطلح محدد يشمل فقط، المواد القابلة للترشيح الثابتة عن تعرضها للحرارة من أصل بكتيري لم يستخدم حتى عام 1923م. إن استجابة الحيوانات المعبر عنها بارتفاع درجة الحرارة هي أهم صفة مميزة وذات تأثير بيولوجي ثابت ومتناسق ينتج اتجاه التعرض للسموم الداخلية.

ولهذا السبب فقد درست هذه الخاصية بإسهاب واستخدمت كفحص بيولوجي للسموم الداخلية.

إن الحيوانات المختلفة لها حساسية باتجاه مولد الحمى (Pyrogen) إما بخفض درجة حرارة جسمها أو بارتفاع درجة حرارة جسمها ففي الفئران والجرذان تسبب السموم الداخلية خفض درجة حرارة جسم الحيوان. أما في الأرانب، الكلاب، الخيول والإنسان فان ارتفاع درجة حرارة الجسم هي المألوفة نتيجة التعرض للسموم الداخلية. إن الارتفاع في درجات الحرارة واستمرار بقائها

الذي يتبع حقن السم الداخلي في الوريد يعتمد على مقدار الجرعة المحقونة، إن كمية قليلة من السم الداخلي بمقدار 0.001 ملغم لكل كيلو غرام من وزن الجسم تكون كافية لتوليد الحمى في الإنسان والأرانب. ففي الأرانب لا يتم
10 ملاحظة أي تفاعل ولمدة 20-30 دقيقة بعد الحقن يتبع ذلك ارتفاع في درجة الحرارة يصل الذروة (Peak) بعد مرور ساعة واحدة من وقت الحقن. ان الجرع القليلة تولد استجابة ضعيفة في ارتفاع درجة الحرارة ثم تعود إلى حالتها الطبيعية بعد مرور ساعات قليلة. أما الجرع العالية فإنها تولد استجابة أولية عالية في ارتفاع درجة الحرارة بعد ساعة واحدة من الحقن، بعدها يحدث انخفاض في درجة الحرارة خلال الساعة التالية للساعة الأولى ثم يبدأ ارتفاع ثانٍ في درجة الحرارة تكون شدته أعلى من ارتفاع درجة الحرارة في الفترة الأولى، يصل أقصاه بعد 2-4 ساعة من زمن الحقن (شكل 10-2). ثم تعود درجة الحرارة إلى حالتها الطبيعية بعد مرور 5 ساعات. إن هذه الحمى الثنائية الطور (Biphasic) والتي تحدث في الإنسان، الكلاب، الخيول والأرانب تمثل استجابة مثالية (نموذجية) للمضيف اتجاه السموم البكتيرية الداخلية.

تحدث الحمى الناتجة عن السموم الداخلية إما مناعياً مبنية على تفاعل فرط الحساسية أو نتيجة لإفراز مولد الحمى البروتيني في جهاز الدوران والذي ينتج عنه تدميراً لأنسجة مركز منظم الحرارة ما تحت السرير البصري (Hypothalamus) كما يعقب التحفيز في ارتفاع درجة الحرارة هذا ظهور قابلية تحمل لدى الحيوانات المعرضة لهذه السموم وقد تستمر قابلية التحمل هذه لعدة أسابيع.



شكل 10-2 : الاستجابة للحمى في الأرانب عند تعرضها لجرع مختلفة من السم الداخلي المحقون في الوريد.

(أ) جرعة واطئة بعد فترة حضانة 10-20 دقيقة حيث ترتفع حرارة الجسم بعدها حتى تصل أعلى مستوى بعد مرور ساعة.

(ب) جرعة عالية تتبعها فترة حضانة قصيرة جداً بعدها ارتفاع في درجة حرارة الجسم حيث تصل إلى أعلى مستويين أولهما بعد ساعة والآخر بعد ثلاثة ساعات.

جـ- فاعلات المضيف الموقعية والعامة تجاه الحقن المتكرر بالسموم الداخلية.

عند حقن حيوان بالسموم الداخلية، مرتين، تكون الفترة الزمنية الفاصلة بينهما مضبوطة، فأن إحدى هاتين الاستجابتين ممكن ان تحدث.

أما ان تتكون استجابة موقعية، تفاعل جلدي أو تفاعل عام. ان الظاهرة الموقعية تُعرف بتفاعل شوارتزمان (Shwartzman) المكتشف عام 1937م. ينتج هذا التفاعل في الأرانب حيث يتم حقن السم الداخلي في البشرة أو الجلد وبعد

مرور 24 ساعة يتم حقن السم الداخلي عن طريق الوريد، وخلال الستة (6) ساعات التالية يلاحظ نزف دموي وموت الأنسجة في منطقة البشرة التي حقن السم فيها أولا. إن السم الداخلي المستخدم في الحقن الوريدي ممكن ان يكون من نفس المصدر البكتيري أو من مصدر بكتيري آخر وحتى ممكن ان يكون من مصدر ليس له علاقة ببكتيريا السالبة لجرام كأن يكون مادة مستخلصة من بكتيريا الكرام الموجب أو نسيج كلايكوجين الكبد. إن المواد من غير السموم البكتيرية الداخلية ممكن أن تثير أو تستفز التفاعل الجلدي، أحيانا، في الحيوانات الحساسة للسموم الداخلية إلا أنها ليست لديها القدرة على حث أو إحداث تفاعل الحساسية في البشرة.

أما بالنسبة للتفاعل العام الذي يحدث بسبب السموم الداخلية فقد اكتشف عام 1924م تفاعل سنارلي (Sanarelli) حيث لقحت حيوانات (الأرانب) عن طريق الوريد بجرع تحت المميته (Sublethal) من بكتيريا الكوليرا Vibrio cholerae وبعد 24 ساعة أعطي سموماً داخلية بكتيرية عن طريق الوريد أيضا تمثل رواشح بكتيريا القولون E. coli وبكتيريا الـProteus spp وقد هلكت معظم الأرانب المحقونة ووجد عند تشريح الحيوانات الهالكة وجود تلف ونزف دموي وموت الأنسجة في منطقة الأغشية المساريقية والكلية، وتم عزل جرثومة Vibrio cholerae من منطقة المساريقي التالفة ويسمى هذا التفاعل أحيانا بتفاعل شوارتزمان العام (Generalized shwartzman reaction).

يعتقد ان التفاعل الموقعي والتفاعل العام متشابهان من حيث الأساس. وعلى أية حال لوحظ اختلافات معينة بين التفاعلين ففي التفاعل الموقعي وبعد عملية الحقن الثانية، يلاحظ انسداد الأوردة الصغيرة والشعيرات الدموية في منطقة البشرة التالفة أو المتضررة وهذا الانسداد ناتج عن تجمع كريات الدم

البيضاء والصفائح الدموية. أما في التفاعل العام فان الكبيبات الشعرية الكلوية تصبح مسدودة بمادة متجانسة غير متبلورة مشابه لمادة الليفين (Fibrin).

د- تأثير السموم الداخلية على الجهاز الدموي الوعائي

إن الجهاز الدموي الوعائي حساس جداً للسموم الداخلية. وعلى سبيل المثال، فأن جرع صغيرة أو قليلة من السموم الداخلية تجعل الأوعية الدموية أكثر حساسية (سريعة التأثر) بمادة الأدرينالين. وهي الحالة المشابهة لحالة فرط الفعالية (Hyperreactivity) التي تحدث في تفاعلات شوارتزمان - سنارلي المذكورة آنفا. بعد حقن السم الداخلي في الوريد يحدث اضطراب وظيفي أولي في الأوعية الدموية الصغيرة والذي يؤدي إلى تأثيرات شمولية على عملية الدوران المؤدية إلى هبوط في ضغط الدم والذي بدوره يسمم الحيوانات وتتوج هذه التغيرات بالصدمة أو الموت. ويبدو أن هذه التغيرات تعتمد على إفراز أو تحرير مواد لها تأثيرات فعالة على الأوعية الدموية مثل الهستامين (Histamine)، السيروتونين (Serotonin)، النورادرينالين (Noradrenalin) وكنين المصل (Plasma kinin). وقد قورنت الصدمة الناتجة عن السموم الداخلية بالصدمة الناتجة عن الجروح أو نزف الدم. ففي الكلاب مثلاً تحدث السموم الداخلية هبوطاً في ضغط الدم في الجهاز الوعائي الشرياني وبطئاً في ضربات القلب (Brady cardia) يتبعها سرعة في النبض (Tachycardia).

هـ- نزف وموت نسيجي موضعي للأورام الخبيثة.

في نهاية القرن التاسع عشر لوحظ بان خليط من البكتيريا تتلف الأورام الخبيثة بواسطة ما تسببه من نزف دموي حاد في كتلة الورم. وقد أدى ذلك إلى محاولات لاستخدام تحضيرات مختلفة منها خليط سموم كوليز (Coley's mixed toxins) في علاج السرطان. وقد جرت محاولات معدودة لتحديد الجزء الفعال

الذي تعزى له هذه الخاصية إلا انه لم يكتشف حتى عام 1943م عندما وجد بان السم الداخلي المحفز من بكتيريا Serratia marcescens أكثر فعالية بمقدار 300 مرة من خليط السموم الخام. وقد أظهرت الدراسات بان المستضدات (الانتيجينات) الجسمية السامة لبكتيريا السالبة لجرام تمثل العوامل التالفة للأورام الخبيثة . تعمل 10
السموم الداخلية بطريقة اختيارية على تدمير نسيج الأورام السرطانية الخبيثة دون ان تؤثر على الأنسجة السليمة المتاخمة لهذه الأورام. وعلى أية حال فان هذه السموم لا تدمر خلايا الأورام الخبيثة النامية في مزروع الأنسجة، خارج الجسم الحي، ولهذا يعتقد بان فعاليتها في تدمير الأورام الخبيثة، داخل الجسم الحي، يعود إلى تأثيرها على محرك الأوعية الدموية (Vaso motor)، انقباض الأوعية الدموية والاستجابة الايضية لجسم الحيوان ككل والتي يعتقد بان من خلالها تبدأ عملية تدمير الأنسجة الغير طبيعية (الأورام الخبيثة).

و- السموم الداخلية كمواد مساعدة أو مقوية (Adjuvant) .

ان الاستجابة المناعية في الحيوانات للمستضدات (الانتيجينات) المحفزة ممكن ان تُبرز بواسطة الحقن المتزامن للسموم الداخلية مع تلك الانتيجينات. ان إعطاء السموم الداخلية للحيوانات المستلمة للانتيجينات المحفزة تحث أو تستفز استجابة مناعية بارزة (أو مؤكدة) حيث يمكن الكشف عن الأضداد (الأجسام المضادة) لتلك المستضدات بصورة مبكرة كما ويزداد مستوى الأضداد (الأجسام المضادة) بصورة سريعة حيث يمكن الوصول إلى أعلى تخفيف من مستوى للأضداد (الأجسام المضادة titer)* والذي يعطي تفاعل التلازن موجب جيد مع تلك المستضدات (الانتيجينات). لقد اكتشف هذا التأثير بوجود بكتيريا السالبة لجرام في اللقاحات المتعددة المستضدات (الانتيجينات) (Polyvalent) والتي تولد

---

* Titer : معكوس أعلى تخفيف من الأضداد (الأجسام المضادة) والذي يعطي تفاعل التلازن موجب مع المستضدات (الانتيجينات).

أضداد (أجسام مضادة) متعددة، ولقد وجد ان جزء الدهنيات العديـدة التسكر هو المكون الفعال أو المحفز لهذه العملية. ويعتقد ان هذا التأثير يعـود إلى تغـير في قابلية النضوح الخلوية في مواقع تكوين الأضـداد (الأجـسام المـضادة) أو إفـراز الحوامض النووية التي تعمل كمحفزات على مواقع خلويـة أخـرى معينـة تقـوم بتكوين الأجسام المضادة.

5. دور السم الداخلي في حدوث المرض.

تعتمد الأنشطة البيولوجية ، قيد أي دراسة، من حيث الأساس على حقـن السموم الداخلية تجريبيـاً في حيوانـات التجـارب. ومما لاشـك فيـه فـان نفـس التأثيرات يتم الحصول عليها في المرضى من جراء حقن المحاليل الوريديـة الملوثـة بأعداد كبيرة من بكتيريـا الـسالبة لجـرام وسمومهـا. كمـا أن المرضـى المعـالجين بالمحاليل الوريدية يكونون بحالة من الضعف والأذى أو الـصدمة الـتي تـؤدي إلى الوفاة من جراء تلك السموم.

ليس من السهل حسم دور السم الداخلي في حدوث المرض بصورة طبيعية وذلك لان السموم الداخليـة ليـست محـصورة أو مقيـدة التواجـد أو الارتبـاط ببكتيريـا الـسالبة لجـرام المرضـية أو الممرضـة (Pathogenic G-bacteria) ولهـذا السبب فهي لا تعتبر عامل محدد أولي لحدوث المرض (Primary determinant of pathogenicity) . كما انه من المفترض أن تفـرز وتحـرر هـذه الـسموم في جـسم المضيف، فقط، من قبل الكائن الحي الممرض. هناك شـواهد قليلـة تـشير إلى ان السموم الداخلية تمتص من قبل جدار البلعوم، ولكي تكون هذه السموم قـادرة على إصـابة المـضيف أو التـأثير فيـه لابـد مـن تحريرهـا أو إفرازهـا إلى أنـسجة المضيف. عندما تحدث الإصابة ببكتيريا الـسالبة لجـرام وخـصوصاً في المراحـل النهائية من عملية الإصابة وحدوث المرض كنتيجة لذلك فان العلامات المميـزة

للمرض متشابهة تماماً لإعراض التسمم الناتجة عن حقـن الـسموم الداخليـة في الحيوانات (حيوانات التجارب) بصورة اصطناعية. علماً بان عدد بكتيريا السالبة لجرام ، وقت هلاك أو موت الحيوان يكون ثابتاً مما يشير إلى ضرورة الوصول إلى تركيز معين من السم الداخلي، داخل جسم المضيف، قادراً على إحداث المـوت أو هلاك الحيوان.

إن الحمى هي العلامة المألوفة لحدوث الإصابة بكتيريا السالبة لجـرام كمـا في الحمى التيفوئيدية والباراتيفوئيديـة والإصـابة ببكتيريـا البروسـيلا (Brucella spp) ويلاحظ غالباً بان معالجة الحمى الراجعة (المتسببة عن بكتيريا البروسـيلا) باستخدام مضاد حياتي واسع المـدى (Wide spectrum antibiotic) والـذي مـع ذلك يتُبع بارتفاع درجة الحرارة حيث يعزى ذلـك إلى تحريـر الـسموم الداخليـة كنتيجة لموت بكتيريا السالبة لجرام .

ولا تـزال هنـاك شـكوك كـبيرة حـول دور الـسموم الداخليـة في حـالات التفاعلات المناعية أي تفاعل فرط الحساسية، ففي بعـض الأحيـان يكـون تـأثير السم الداخلي مشابهة لظاهرة الحساسية وبـذلك تـصبح الحيوانـات ذات قابليـة لتحمل السموم الداخلية عند تعرضها إلى عـدد مـن الجـرع تحـت المميتـة (Sub lethal dose). كما ان معظم التجارب التي أجريت حـول هـذه الظـاهرة تتعلـق بقابلية التحمل لارتفاع درجة الحرارة الناتجة عن تأثير السم الداخلي. ان الجرعة الأولى من السموم الداخلية تجعل الحيوان جزئياً ذا قابلية لتحمل هـذه الـسموم، أما الحقن المتكرر بجرع متزايدة فإنها تجعل الحيوان مقاوماً لهذه السموم. كما لابد من الإشارة أن قابلية التحمل هذه هي ليـست خاصـة ضـد سـم داخلـي معـين حيث من الممكن ان نجد حيواناً قد وُلِدّت فيه قابلية تحمل ضد سم داخلي معين له نفس قابلية التحمل عند تعرضه لسم داخلي من نـوع آخـر لـيس لـه علاقـة بالنوع الأول إطلاقا. وعلى العكس من ظهور قابلية التحمل لدى مضيف معين

نجد في حيوان آخر ظهور ما يسمى بفرط الحساسية أو فرط الفعالية لجرعات متعاقبة من نفس السم أو لمستضدات (الانتيجينات) غير سامة أخرى ليس لها علاقة بالسم المعني كما في تفاعل شوارتزمان – سنارلي.

وعلى أية حال ومن خلال ما تقدم، يبقى دور السم الداخلي في حدوث المرض غير واضح أو محسوم بصورة قطعية خصوصاً ما يتعلق بدوره في حدوث الإصابة الطبيعية ببكتيريا السالبة لجرام

.(Morrison & Ryan, 1992; Hemut et al., 1994; Forbes et al., 2002).

6. التقييم الإحيائي لفعالية السموم داخل وخارج جسم الكائن الحي.

The Bioassay Of Endotoxin in vivo & in vitro

عند دراسة التأثيرات الفسلجية المرضية المتسببة عن السموم الداخلية هناك كثير من هذه التأثيرات تعتمد على مقدار الجرعة المعطاة. معظم التقييمات الإحيائية للسموم الداخلية تعتمد على سميتها للخلايا الحيوانية السليمة (Intact cells) وهذه التقييمات تحتاج إلى أوقات زمنية معينة للتعبير عنها. ويمكن التعبير عن السمية بالقابلية على توليد الحمى، الإجهاض، التهابات سوائل أغشية المفاصل، الموت الموضعي للجلد و الموت. ان التقييمات الإحيائية ممكن ان تحدد بمستويات واطئة جداً من التراكيز، مثلاً 0.0003 مايكروغرام، إلا أنها لا تمثل التقديرات الكمية ذات الدقة العالية لان التأثير ممكن ان يُقّوي أو يُضْعّف بوجود المواد الايضية الناتجة عن الأنسجة المتضررة بفعل السم. وهناك مدخل آخر لتقييم السموم إحيائيا والذي هو أكثر دقة من الناحية النوعية (التخصصية) و الكمية وهو التقييم بالمستضد (الانتيجين) (Antigen assay) كاستخدام الضد المتألق (Fluorescent antibody) لتعين مستضد السم الداخلي، تثبيط أو كبح عملية التلازن بين السم الداخلي وكريات الدم الحمراء المحسسه أو قياس كمية

الضد (الأجسام المضادة) المحفز تكوينها بواسطة السموم الداخلية.

حديثاً تم استنباط وسيلة لتقييم فعالية السموم الداخلية خارج جسم الكائن الحي وتدعى بفحص تخثر حلالة حيوان بحري (ملك السراطين) (Limilus 10 lysate coagulation test)* إن حساسية هذا الفحص تصل إلى قياس كمية تصل إلى اقل من 10 بيكوغرام من السموم الداخلية يتضمن الفحص حلالة من الخلايا الأميبية (Amoebocytes)* لدم حيوان السرطان البحري البالغ المسمى بـLimulus polyphemus . يؤخذ الدم بواسطة عمل ثقب في القلب وتجمع خلايا الدم وتغسل بمحلول متعادل ثم تحفظ في جو بارد بدرجة 4مْ تخزن لمدة 48 ساعة ثم ترسب الخلايا بجهاز الطرد المركزي، ويجمع الراشح ويحفظ بمحلول متعادل ويستمر التخفيف لحين تكون هلاماً صلباً عند إضافة السم الداخلي الخام المستخلص من بكتيريا القولون B_6 , E coli O_{26} بتركيز 10^{-6} مايكروغرام/ مل بفترة زمنية لا تتجاوز ثلاث ساعات. ان الحلالة (Lysate) النهائية تخزن بدرجة حرارة -60مْ وينجز الفحص بحضن 0.1 مل من هذه الحلالة مع 0.1 مل من المادة الحاوية عل السم الداخلي بدرجة حرارة 37مْ ويلاحظ تكوين هلام أو دبقة لزجة خلال 4 ساعات والذي يشير إلى وجود السم الداخلي. أما فحوصات السيطرة فتتضمن السم الداخلي لوحدة، الحلالة مع المحلول المتعادل لوحدها وتحضن بنفس الظروف.

* Limulus: حيوان بحري من المفصليات يدعى ملك السراطين.

* Amoebocytes : خلايا تتواجد في الانسجة والسوائل الجسمية للحيوانات اللافقارية لها حركة مشابهة لحركة الاميبا الابتدائية.

7. التأثيرات الرئيسية الناتجة عن السموم الداخلية

The Main Effects of Endotoxins

نرى من الضروري ذكر أهم التأثيرات الرئيسية الناتجة عن السموم الداخلية وذلك لإزالة الغموض المحيط بها من حيث طبيعتها، تسميتها، فعلها، موقعهـا في الخلية. ومهما يكن الحال فان التأثيرات الناتجة من هذه المواد هي ما يلي:

أ- قدرتها على إحداث الحمى.

ب- فعلها القاتل في الفئران.

جـ- زيادة عدد كريات الدم البيضاء فوق العـدد الطبيعـي كمـا يحـدث في حالة الإصابة بالمرض.

د- حث العامل المتمم أو المكمل (Complement).

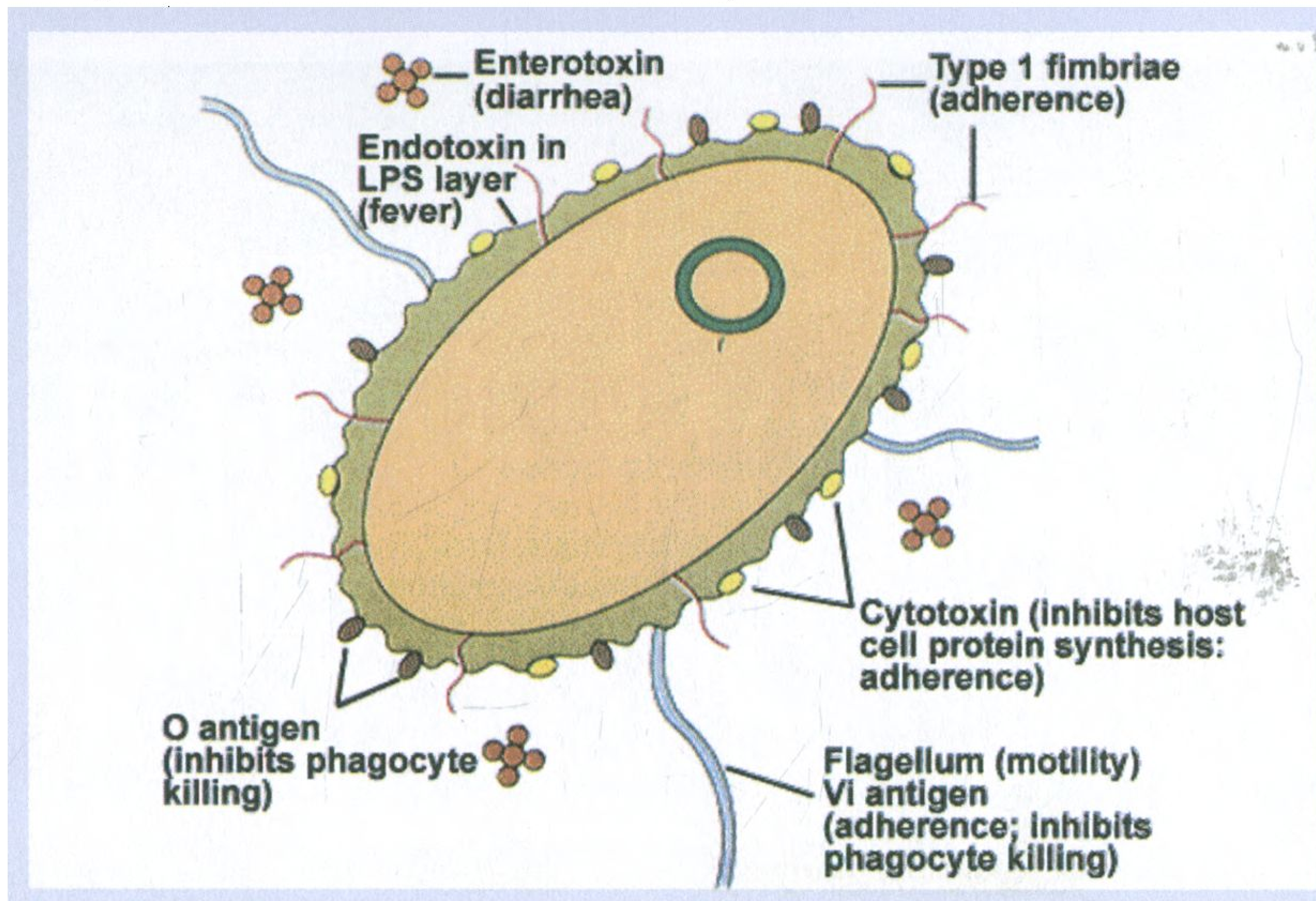
هـ- انخفاض ضغط الدم.

و- حث المقاومة غير النوعية أو التخصصية للإصابة.

ز- حث حالة المقاومة للعلاج ضد توليد الحمى الناتجة عنها.

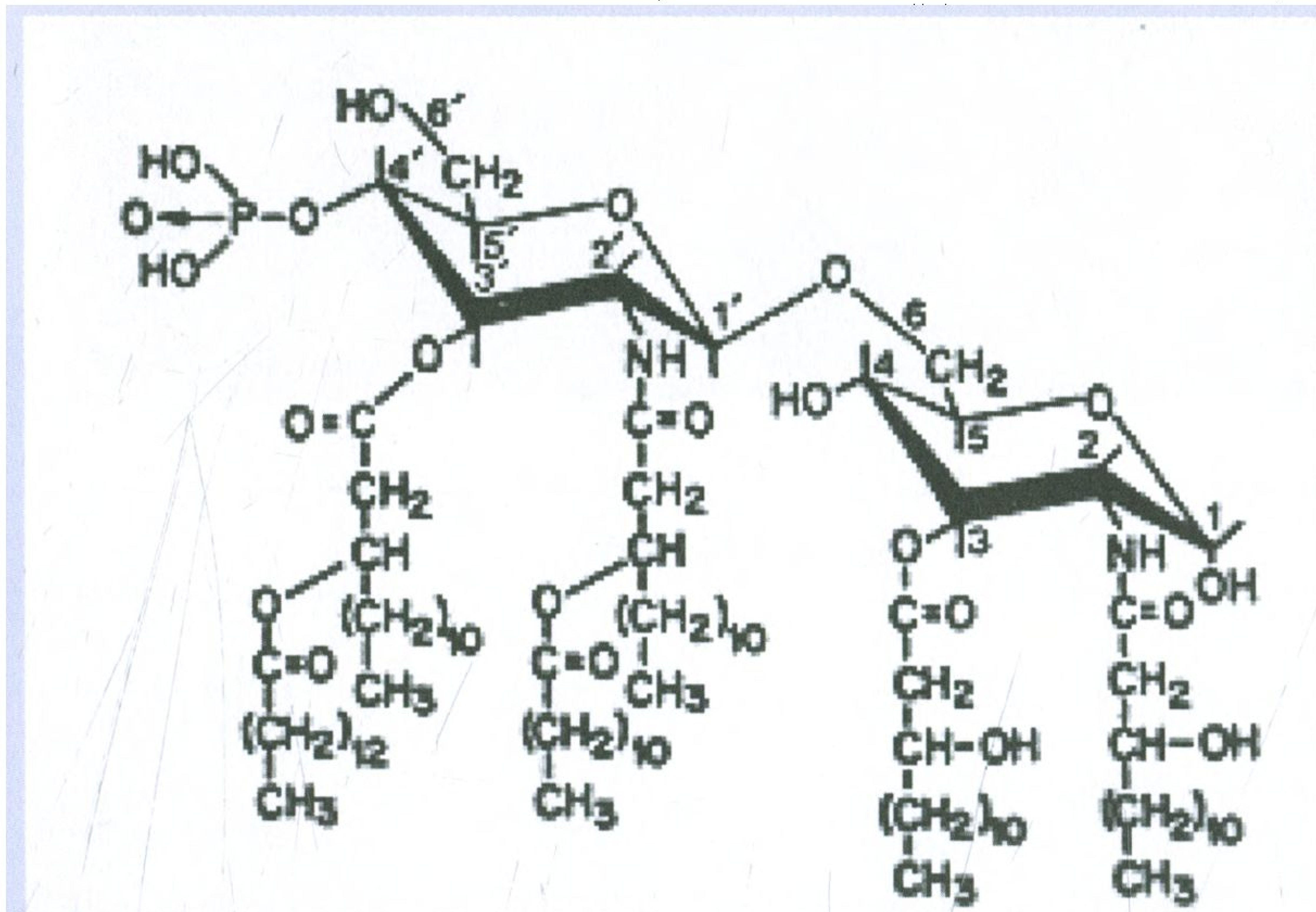
حـ- تنشيط الخلايا البلعمية الكبيرة.

ط- حث تكوين الانترفيرون.



خلية بكتيرية سالبة لكرام لاحظ طبقة LPS الحاوية على السم الداخلي

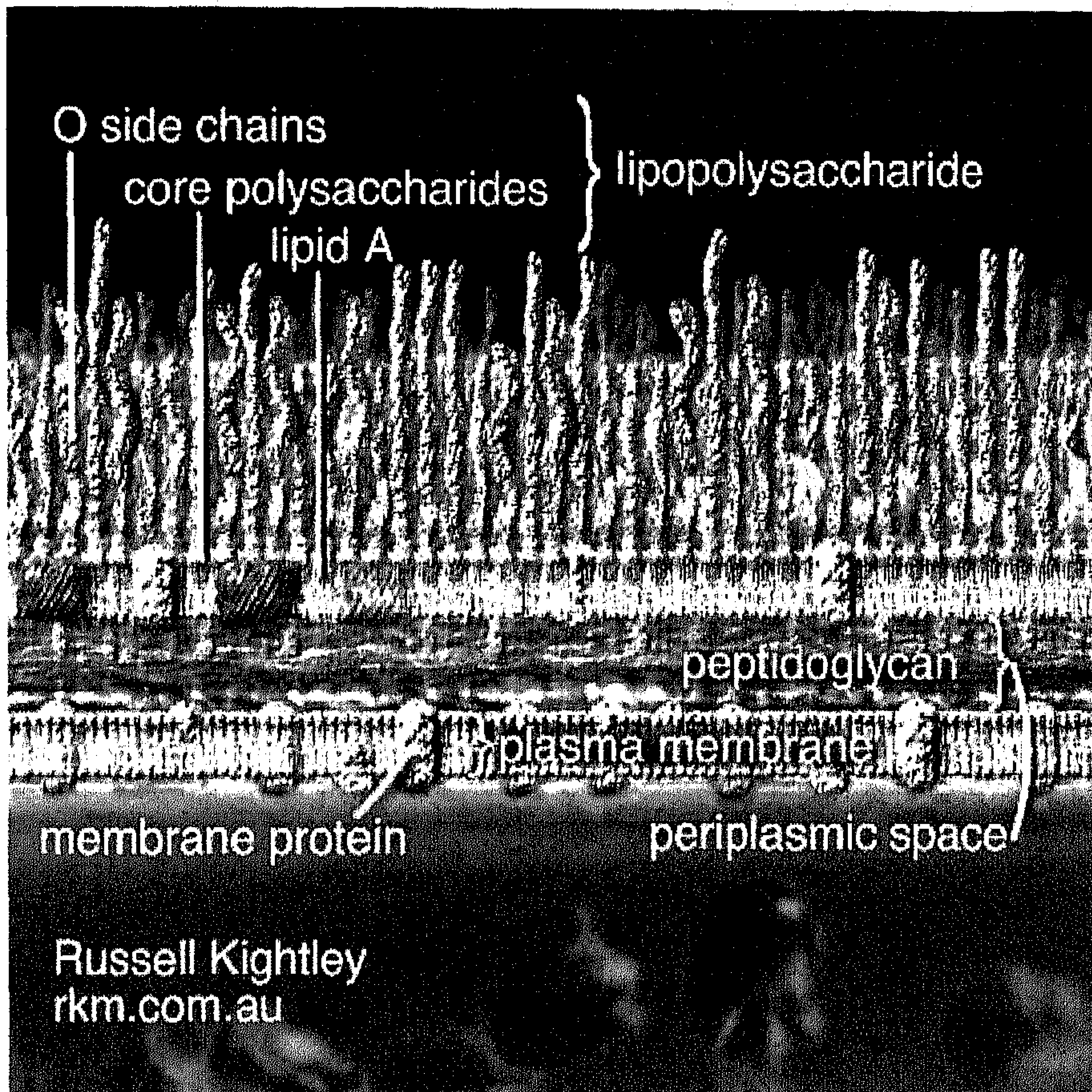
www.agen.ufl.edu



Complete structure of the Lipid A Moiety of LPS of *S. typhimurium*, *S. minnesota*, and *E. coli*

التركيب الكيميائى لجزء الدهن A في طبقة LPS في بعض البكتيريا السالبة لكرام

Todar , 2008 on line



جدار الخلية البكتيرية السالبة لكرام - مكونات السم الداخلي Endotoxin

www.geocities.com

الفصل الحادي عشر

11

1. المصطلحات العلمية

-A-

المعدة الرابعة للحيوانات المجترة	Abomasum
خراج	Abscess
مساعد مقوي	Adjuvant
التلازن	Agglutination
جهاز محلل الأحماض الامينية	Amino acid analyzer
سم الاميلوفورين	Amylovorin
مضادات حيوية	Antibiotics
الضد (الأجسام المضادة)	Antibody
الترياق (مضاد السم)	Antidote
مستضد	Antigen
التقييم الإحيائي بالمستضد	Antigen assay
مضادات نواتج التمثيل الايضي	Antimetabolites
مضادات السموم او مضادات الذيفانات (الترياق)	Antitoxin

-B-

الفاصوليا	Bean

Bioassay	الاختبار الإحيائي (التقييم الإحيائي)
Botulism	التسمم الوشيقي
Brady cardia	بطيء ضربات القلب

-C-

Castration	إزالة الخصى
Chemopathogens	ممرضات كيميائية
Chlorosis	الاصفرار (الشحوب اليخضوري)
Colitis	التهاب غشاء القولون المخاطي الحاد
Collagenase	إنزيم الكولاجينيز
Compartmentalization	التقسيم الى أجزاء مستقلة
Convulsion	تشنج
Coronatine	سم الكوروناتين
Cross reaction	تفاعل تصالبي
Culture	مزروع كائنات مجهرية حية
Cytolytic toxin	السم المحلل للخلايا

-D-

Denovo	من جديد، كرة أخرى
Determinant	عامل محدد (مقرر)

-E-

Electrophoresis	الترحيل الكهربائي
Emetic	مقيئ

Endemic	مرض مستوطن
Endotoxin	السم الداخلي (سم داخلي المنشأ)
Enterotoxin	السم المعوي
Epidemic	مرض وبائي
Epithelial	طلائي (ظهاري)
Exotoxin	السم الخارجي

-F-

Fatty acid	الحامض الدهني
Febrile	حمي أو متعلق بالحمى
Fire blight	مرض لفحة النار
Focus	مركز المرض أو العدوى

-G-

Gastritis	التهاب غشاء المعدة المخاطي
Gastroenteritis	التهاب غشاء المعدة والأمعاء
Gene	جين (ورثة)
Glycopeptide	الغليكوببتيد
Glycoprotein	الغليكوبروتين
Glytoxin	سم الكلايتوكسين
Growth curve	منحنى النمو

-H-

Haemolysin	هيمولايسين (السم المحل للكريات الدموية الحمراء)

Halo-blight	مرض لفحة الهالة
Hyperreactivity	فرط الفعالية
Hypersensitivity	فرط الحساسية
Hypothalamus	ما تحت السرير البصري

-I-

Immunoglobulin	كلوبيولين مناعي
Immunization	تمنيع
Infract	إحتشاء
Inhibitor	تثبيط، كبح، منع
Ion-exchange chromatography	كروماتوغرافي تبادل الايونات

-J-

Jaundice	اليرقان

-L-

Leaf blight	آفة الأوراق (لفحة الأوراق)
Lipase	لايبيز الإنزيم المحلل للدهنيات
Lipopolysaccharides	دهون عديدة التسكر
Lymphadenitis	التهاب الغدد اللمفاوية

-M-

Mass spectroscopy	قياس الأطياف الكتلي
Metabolism	الفعاليات الايضية

Metabolites	نواتج الفعاليات الايضية
Mitral	قلنسي او تاجي
Mitral valve	الصمام القلنسي او التاجي
11 Mycotoxin	السموم المنتجة من قبل الفطريات

-N-

Naphthazarine	نفثازارين
Necrosis	الموت الموضعي للنسيج
Necrotize	يتنكرز او مصاب بالتنكرز (الموت الموضعي للنسيج)
Nuclear magnetic resonance	الرنين النووي المغناطيسي

-O-

Odema	الاستسقاء
Organic acid	حامض عضوي
O-specific antigen	المستضدات الجسمية – النوعية

-P-

Pandemic	وبائي متفشي على مستوى قارة أو عالم
Pathogen	كائن مجهري ممرض
Pathogenesis	نشوء المرض
Pathogenic	أحياء مجهرية ممرضة
pathogenicity	الامراضية أو المرضية

Pathotoxin	سم ممرض
Pathovar	ضرب ممرض
Peptide	ببتيد
Peritoneal	خلب (البريتون)
Phagocytosis	البلعمة (الالتهام)
Phaseolotoxin	سم الفيزيولوتوكسين
Phospholipase	الإنزيم المحلل للدهون المفسفرة
Phytopathogens	كائنات ممرضة للنباتات
Phytotoxic	سام للنبات
Phytotxin	سم نباتي
Pneumonitis	التهاب ذات الرئة
Poison	سم
Potency	الفعالية
Polyketide	بولي كتايد
Polypeptide	متعدد الببتيدات
Polysaccharide	السكريات المتعددة
Predispostion	تهيئة أو النزوع لشئ (تهيئة للتعرض للمرض)
Postration	إعياء
Pyrogen	مولد الحمى

-Q-

Quantitative	كمي
Qualitative	نوعي

-R-

Receptor	الجزء المستقبل أو المتقبل
Resistance	المقاومة
Rhizobitoxine	سم الرايزوبتوكسين

-S-

Saprophyte	رمية التغذية
Sensitized	محسس
Shearing	قص الصوف
Specific activity	الفعالية النوعية
Somatic antigen	مستضد جسمي
Substrate	المادة الخاضعة لفعل أنزيم ما
Susceptible	معرض للإصابة
Susceptibility	التعرض للإصابة
Synovial	سائل تفرزه أغشية المفاصل
Syringomycin	مضاد حيوي (السرينجيومايسين)
Syringotoxin	سم (السرينجيوتوكسين)

-T-

Tabtoxin	سم التابتوكسين
Tachycardia	سرعة النبض
Tagititoxin	سم التاجيتيتوكسين

Telepathogenic	كائنات ممرضة عن بعد
Telepathogenesis	نشوء المرض عن بعد
Terpenoid	ترينويد
Titer	غيار
Toxicity	السمية (قابلية توليد السموم)
Toxin	سم (الذيفان)
Transudation	تحلب، تفصد
Tuberculin	السلين

-V-

Victorin	سم الفكتورين
Virulence	حدة شدة المرض
Viscous	لزج، دبق
Vivotoxin	سم الفيفوتوكسين

-W-

Wildfire disease	مرض النار الهائجة
Wild fire toxin	سم النار الهائجة (التابتوكسين)
Wilting	الذبول

المصادر العلمية

11

1) Abedon, s. T. and Lejeune, J.T. (2005) why Bacteriphage encode exotoxins and other virulence factors. Evolu. Bio. Informatics. I, 97-111.

2) Ajl , S.J., Kadis , S., Monti , T. C. and Weinbaum. Eds. (1970, 1971). Microbial toxins Vols- I- V . Academic Press.

3) Aktories, k.(1997). Rho proteins; targets for bacterial toxins. Trends Microbiol. 5, 282-288.

4) Alouf, J.E. and popoff, M.(2006). The comprehensive source book of bacterial protein toxins. 3rded. Academic press San Diego. CA.

5) Arnon, Ss. (1997). Human tetanus and human botulism. In: Rood, JI, McClane, BA., Songer, JG. And Titball, RW. (Eds.) (1997). The clostridia: Molecular biology and pathogenesis. San Diego. Academic press. P. 95-115

6) Averbuch- Hellel, L. and Leigh , RJ. (1997). Medical treatments for abnormal eye movements. Pharmacological, optical and immunological strategies. Aust. NZ. J. Ophthalmol. 25 : 7-13.

7) Backman, P.A., and De Vay, J. E. (1971). Studies on the mode of action of and biogenesis of the phytotoxin syringomycin.Physiol, plant pathol. 1, 215- 234.

8) Ballio, A. (1981). Structure – activity relationships. In (Toxins in plant disease) (Ed. By Durbin R. D.). Academic press New York.

9) Ballio, A., Bossa, F., Collina, A., Gallo., M., Lacobellis, NS., Paci, M., Pucci, P. Scaloni, A., Segre, A. and Simmaco, M.(1990). Structure of syringotoxin, a bioactive metabolite of *pseudomonas syringae pv syringae*. FEBS lett. 269, 377-380.

10) Bambury, J. R. , and story, F. M. (1971). 12, 13 – epoxy trichothecenes. In Microbial toxin. VII Algal and fungal toxin. (S. Kadis, A. Ciegler, and S. J. Ajl, eds.), P 207- 292. Academic press, New York.

11) Bateman, D. F., and Basham, H. G. (1976). Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. In " physiological plant pathology'' (R. Heitefuss and P. H. Williams, eds.), PP. 316- 355. Springer – Verlag, Berlin and New York.

12) Beer, S. V., and Woods, A. C. (1978) Distribution of *Erwinia amylovora* amylovorin and in apple (Malus Pumila)shoots inoculated with the fire blight pathogen. Proc. 4th Int. Conf. Plant. Pathog. Bacteria Angers France Aug. 27- Sept. 2-1978. Vol. II PP. 471- 478.

13) Beer, S. V., Baker, C. J., Woods, A. C., and Sijulin, T. M. (1977). Amylovorin Production in vitro and partil characterization. Proc. Am. Phytopathol. SOC. 4, 182 – 183. (Abstr).

14) Beer, S. V., Sjulin, T. M., and Aldwinkle, H. S. (1981). Amylovorin- induced shoot wilting: Lack of correlation with susceptiblity to Erwinia amylovora phyto pathology 71,.

15) Bhakdi, S. and Tranum. Jensen, J. (1991). Alpha- toxin of *staphylococcus aureus.* Microbiological revies: 55, 733-751.

16) Bhakdi, S., Bayley, H., Valeva, A. Walev, I., walker, B. and Weller, J. (1996). Staphylococcal alpha toxin, Strephtolysin- O and *Escherichia coli* hemolysin: Prototypes of pore forming bacterial cytolysin- Arch Microbiol. 165, 763-79.

17) Bhatia, A. and Zahoor, S. (2007) .*Staphylococcus aureus* Enterotoxin: A review . JCDR 1, 188-197.

18) Bonventure, P. F. (1970). Nomenclature of microbial toxins: Problems recommendations. In, Microbial toxins, Vol. I. P. 29 (Edited by Ajl, S. J., Kadis. S., and Montiie. T. C). Academic Press.

19) Boyd, E. F. (2005). Bacteriophages and bacterial virulence. In kutter, E and sulakvelidze, A. (Eds.). Bacteriophages: Biology and Application . Boca Raton, FL, CRC press. 223-266.,.

20) Boyd, R. F., and Hoerl, B. G. (1986).Basic Medical Microbiology. 3rd Ed. Little Brown and Company. Boston\ Toronto.

21) Braun, A.c. (1955). A study on the mode of action of the wildfire toxin. Phyto pathology 45, 659- 664.

22) Bronson, C. R., and Scheffer, R. P. (1977). Heat- and aging induced of Sorghum and Oat tissues to host selective toxins. Phyto Pathology. 7, 232- 1238.

23) Buchanan, G. E., Starr, M. P. (1980). Phyto toxic material from association between *Erwinia-amylovora* and pear tissue culture: Possible role in necrotic symptomatology of fire blight disease.

Current Microbiol. 4, 67- 72.

24) Collier , RJ. (1990). In: Moss , J. Naugham , M. (Eds.) . ADP – ribosylafing toxins and g protein . Washington: American society for Microbiolgoy. P. 3-19.

25) Comstock, J. C. scheffer, R. P. (1973). Role of host- selective toxin in colonization of corn leaves by *Helmin thosporium-Carbonum.* Phyto Pathology disease. (Ed. By R. D. Durbin). PP. 331- 394. Academic Press, New York, London. 63, 24- 29.

26) Crosthwaite, L. M., and sheer, S. J. (1979). Inhibition of ribulose 1,5 – bispohosphate carboxylase by a toxin isolated from *pseudomonas tabaci.* Phyto Pathology 69, 376- 379.

27) Cullimore, J. V. and Sims, A. P. (1980). An association between photo respiration and protein catabolism: Studies with *chlamydomonas.* Planta, 150, 392- 396.

28) Dalla, S.M. , Fagiuoli , G. , Nordera, P., Bernhart, I., Della , V.C. , DiGiorgio, D. , Ballio, A. and Menestria , G. (1999) . The interaction of lipodesipeptide toxins from *pseudomonas syringae PV. Syringae* with biological and model membranes: a comparison of syringotoxin, syringomycin , and two syringopeptins. Molecular plant Microbe interactions. 12 , 391-400.

29) Daly, J. M. (1976). Some aspects of host- pathogen interactions. In: physiological plant pathology. (Ed. By H. Heitefuss and P. H. Williams). PP. 27-50. Springer- Verlag, Berlin, and New York.

30) Daly, J. M. (1981). Mechanism of action. In: toxins in plant disease. (Ed. By R.D. Durbin). PP. 331-394. Academic press, New York and London.

31) Damann, K. E., Jr., Gardner, J. M., and Scheffer, R. P. (1974). An assasy for *Helminthosporium victoriae* toxin based on induced leakage of electrolytes from oat tissues phyto pathology 64, 652-654.

32) Deley, J., Bernaerts, M., Rassel, A., Guilmot, J. (1966). Approach to an improved taxonomy of the genus *Agrobacterium.* J. G. of Microbial. 43, 7- 17.

33) Demain, A. L. (1974). How do antibiotic-producing micro organisms avoid suicide? Ann. N. Y. Acad. Sci. 235, 601- 602.

34) DeVay, J. E., Gonzalcz, C. F., and Wakeman, R. J. (1978).

Comparison of the biocidal activities of syringomycin and syringotoxin and the characterization of isolates of *pseudomonas syringae* from citrus hosts. Proc. 4th Int. Conf. Plant pathol. Bacteriol. PP. 643- 650. Angers.

35) Dey, R., and Van Alfen, N. K. (1979). Influence of *Corynebacterium insidiosum* on water relation of alfa- alfa. Phyto pathology. 69, 942- 946.

36) Dimond, A. E., and Waggoner, P. E. (1953). On the nature and role of vivo-toxins in plant disease. Phyto pathology 43, 229- 235.

37) Durbin, R. D. (1971). Chlorosis- inclucing pseudomonad toxins: their mechanism of action and structure. In: Morphological and Biochemical. Events in plant- parasite interaction. (Ed. By S. Akai S. Ouchi). PP. 369- 382. The phyto pathological society of Japan, Tokyo.

38) Durbin, R. D. (1981). (Ed.). Toxins in plant disease. Academic press, New York.

39) Durbin, R. D. (1991). Bacterial phytotoxins: Mechanisms of action. Experientia, 47 , 776-783.

40) Durbin, R. D., and Sinden, S. L. (1967). The effect of light on the symptomatology of oat halo blight. Phyto pathology. 57, 1000-1001.

41) Durbin, R. D., Uchytil, T. F., Steels, J. A., and Ribeiro, R. deL. D. (1978). Tabtoxinine- B – lactam from *pseudomonas tabaci.* Phytochemistry 17, 147.

42) Dye, D. W. (1968). Ataxonomic study of the genus *Erwinia.* II The "Amyiovora group." New Zealand J. of. Sci. 11, 590 – 607.

43) Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., and Schroth, M. N. (1980). International standards for naming patho vars of phyto pathogenic bacteria and alist of pathovar names and patho type strains. Rev. Plant pathol. 59, 153 – 168.

44) EI- Banoby, F. E., and Rudolph, K. (1979). Polysaccharide from liquid cultures of *Pseudomonas phaseolicola* which specifically induces water- soaking in bean leaves (Phasolus Vulgaris L.). Phyto pathol. 2-95, 38- 50.

45) Feruson, A. R., Johnston, T. S. and Mitchell, R. E. (1980). Resistance of *pseudomonas syringe pv. phaseolicola* to its own

toxin; phaseolo toxin. Federation of Eurapean Microbiological Societies, 7, 123 – 125.

46) Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, s. and Fiorentini, C. (1997). Toxin – induced activation of the G protein P21 Rho by deamidation of glutamine. Nature 387, 729-733.

47) Forbes, B.A., Sahm , D. F. and Weissfeld, A.S. (Eds.) . (2002). Diagnostic Microbiology. 11th . edition Elsevier Science limited. London. Toronto.

48) Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn, T.G. (2004). Taxonomic outline of prokaryotes, Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. Springer- Verlag, New York .

49) Gasson, M. (1980). Indicator technique for antimetabolit toxin production by phyto pathogenic species of pseudomonas. Appl. Environ. Microbiol. 39, 25- 29.

50) Gaumann, E. (1954). Toxins and plant disease. Endeavour, 13, 198- 204.

51) Giannella, RA.(1995) . Escherichia Coli Heat –stable enterotoxins, guanylins, and their receptors: what are they and what do they do? J. Lab. Clin. Med. 125, 173-181.

52) Gilchrist, D. G., and Grogan, R. G. (1976). Production and nature of a host- specific toxin from *Alternaria altevnata F. Sp. Lycopersici*. Phyto pathology. 66, 165- 171.

53) Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Obsorne, B.A. and Kuby, J. (Eds). (2003). Immunology fifth edition. W.H. freeman and company . New York.

54) Good man, R. N., Huang, J. S., and Huang, Pi- Yu. (1974). Host-specific phyto toxic polysaccharide from apple tissue infected by *Erwinia amylovora*. Science. 183, 1081- 1082.

55) Graham, D. C. (1964). Taxonomy of the soft- rot coliform bacteria. Annual Review of phyto pathology 2: 13- 42.

56) Greenwood, D., Slack , R., Peutherer, M. and Barer, M. (Eds.) . (2007) . Medical Microbiology. 17th edition . Churchill Livingstone, Elsevier.

57) Gregory, P., Earle, E. D., and Gracen, V. E. (1977). Biochemical and Ultrastructural aspects of southern corn leaf Blight disease. In " host plant Resistance to pests."(P. A. Hedin, ed.), PP. 90-114.Am. Chem. Soc. Symp. Ser. No. 62.

58) Gross, D. C., and Devay, J. E. (1977). Role of syringomycin in holcus spot of maize and systemic necrosis of cowpea caused by *pseudomonas syringae*. Physiol. Plant pathol. 11, 1-11.

59) Gross, D. C., Devay, J. E. and stadtman,F. H. (1977). Chemical properties of syringomycin and syringo toxin: toxigenic peptides produced by *pseudomonas syringae*. J. Appl. Bacteriol. 43, 453-463.

60) Harringoton, D.J. (1996). Bacterial collagenases and collagen. Degrading enzymes and their potential role in human diseases. Infect Immun 64 , 1885-1891.

61) Hemut, B., Steven, M.O. and Stefanie, N. (1999). (Eds.). Endotoxin in health and disease. Taylor & Francis press.

62) Hess, J. L. and Tolbert, N. E.(1967). Glycolate pathway in Algae. Plant physiology, 42, 371-379.

63) Hewitt, W.(1977). Micro biological assay: An introduction to quantitative principles and evaluation. Academic press, New York.

64) Hoifink, H. A. J., Pelietier, R. L. and Coulson, J. G. (1966). Toxaemia of halo blight of beans. Phyto pathology. 56, 1062-1065.

65) Holmgren,J., Lycke, N. and Czerkinsky, C. (1993). Cholera toxin and chlera- B subunit as oral mucosal adjuvant and antigen vector systems. Vaccine 11, 1179 1184

66) Ichihara, A., Shiraishi, K., Sato, H., H., Sakamura, S., Nishyama, K., Sakai, R.,Furusaki, A. and Matsmoto, T. (1977). The structure of coronatine. J. Am. Chem. Soc. 99, 636.

67) Ikawa, M., Ma, D. S., Meeker, G. B. and Davis, R. P.(1969). Use of chlorella in mycotoxin and phytotoxin research. J. Agric. Food chem. 17, 425-429.

68) Ireland, C. R. and strobel, G. A. (1977). Assay for *Helminthosporium maydis* toxin- binding activity in plants. Plant physiol. 60, 26-29.

69) Keith, D. D. (1975). The absolute configuration of rhizobitoxin. Tetrahedron. 31, 2629- 2632.

70) Kessler , KR. And Benecke, R. (1997) . Botulinum toxin: from poison to remedy. Neorotoxicology. 18, 761-770

71) Khan, I. D. and Rudolph, K.(1978). Development of a detached leaf bioassay for the evaluation of a necrotoxin produced by *pseudomonas syringae*, Van Hall sensu stricto in bean leaves (*Phaseolus Vulgaris, L.*). Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bacteriol. Angers, France, Aug. 27- Sept. 2, 1978, Vol II, PP. 651-655.

72) Koda, Y., Takahashi, J., Kikuta, Y., Greulich, F., Toshima, H. and lchihara, A.(1996) . Similarities of the biological activities of coronatine and coronafacic acid to those of jasmonic acid. Phytochemistry. 41, 93-96.

73) Kono, Y., Knoche, H. W. and Daly, J. M.(1981). Structure: Fungal Host- Specific. In "Toxins in plant disease". (Ed. By R. D. Durbin). PP 221- 257. Academic press, New York.

74) Levine, SR. (1997). Thrombolytic therapy for stroke: the new paradigm. Hosp . Pract. 32, 57-73 .

75) Linton, A. H.(1986). Microbes, Man and Animal. John Wiley and Sons. New York.

76) Litzen berger, S. C.(1949).Nature of susceptibility to *Helminthosporium victoriae* and resistance to puccinia coronata in victoria oats. Phyto pathology. 39, 300- 318.

77) Lottenberg, R. , Minning-Wenz, D. and Boyle, MD.(1994). Capturing host plasminogne: a common mechanism for invasive pathogens? Trneds Microbiol. 2 , 20-24.

78) Ludwing, R. A.(1960). Toxin In " Plant Pathology" (J. G. Horsfall and A. E. Dimond, eds:) , Vol II PP. 315- 357. Academic Press, New York.

79) Luke, H. H., and Gracen, V. E. Jr.(1972). Phyto pathogenic toxin. In: Microbial toxins Vol. VIII. (Ed. By S. Kadis, A. Gieglered S. J. Aji). PP. 131- 137. Academic press, New York.

80) Luke, H. H. and Wheeler, H. E. (1955). Toxin production by *Helminthosporium. Victoriae*. Phyto pathology 45, 453- 458.

81) Madigan, T.M., Martinko, J.M. and Parker, J. (Eds.) . (2002) . Biology of microorganiss. 9th edition. Prentic- Hall, Inc. upper Saddle River, New Jersey.

82) Miflin, E. J. and Lea, P. J.(1976). The pathway of nitrogen assimilation in plants. Phytochemistry. 15, 873- 885.

83) Mitchell, R. E. (1976). Bean halo- blight toxin. Nature(London) 260, 75- 76.

84) Mitchell, R. E. (1978). Halo blight of beans: Toxin production by several *Pseuddomonas phaseolicola*. Isolates. Physiol. Plant pathol. 13, 37- 49.

85) Mitchell, R. E.(1979). Bean halo blight: Comparison of phaseolo toxin and N- Phosphoglutamate. Physiol. Plant pathol. 14, 119-128.

86) Mitchell, R. E.(1981). Structure: Bacterial. In " Toxin, in plant disease. (Ed. By R. D. Durbin). Academic press. New York.

87) Mitchell, R. E. and Bieleski, R. L.(1977). Involvement of phaseolotoxin in halo blight of beans. Transport and conversion to functional toxin. Plant physiol. 60, 723- 729.

88) Mitchell, R. E. and Durbin, R. D. (1981). Tagetitoxin, a toxin produced by *Pseudomonas syringae pv-tagetis*: Purification and partial characterization. Physiol. Plant pathol. 18.

89) Mitchell, R. E. and Parsons, E. A.(1977). Anaturally- Occuring and analogue of phaseolo toxin (bean halo blight toxin). Phyto chemistry 16, 280- 281.

90) Mitchell, R. E. and Young, H.(1978). Identification of achlorosis-inducing toxin of *Pseudomonas glycinea* as coronatine. Phyto chemistry, 17, 2028- 2029.

91) Mitchell, R. E. Durbin, R. D., and Lin. C.(1978). Pseudomonas tagetis toxin: Purificational general biological and chemical characteristics. Phyto pathol. News 12, 201.

92) Moreland, D. E. (1980). Mechanisms of action of herbicides. Annual Review of Plant Physiology. 31, 597- 638.

93) Morrison, D.C. and Ryan,. J. L. (Eds). (1992). Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides: Molecular Biochemistry and Cellular Biology

94) Murch, R. S. and Patil, S. S. (1978). Comparative studies of the exotoxins of *Pseudomonas glycinea* and *Pseudomonas-Phaseolicola*. Can. J. Bot. 56, 282- 287.

95) Nair, G.B. and Takeda, Y.(1998) . The heat – Stable enterotoxins. Microb. Pathog . 24 , 123-131.

96) Naseri, A. and Andreotti, F. (1997). Targeting Neal thrombolytic regimns at specific patient groups: implication for research and cost- containment. Eur Heart J. 18 , 28-35.

97) Nishimura, S., Kohmoto, K. and Otani, H.(1979). The role of host-specific toxin in saprophytic pathogens. In: Recognition factors in relation to disease specificity (Ed. By T. M. Daly and I. Vritani) PP. 133- 146. Baltimore, Maryland.

98) Nishiyama, K., Sakai, R.Ezuka, A., Ichihara, A., Shiraishi, K., Ogasawara, M., Sato, H. and Sakamura, S. (1976). Phytotoxic effect of coronatine produced by *Pseudomonas Coronafaciens var. atropurpurea* on leaves of Italian ryegrass. Ann. Phyto pathol. Soc. Jpn. 42, 613- 614.

99) OBrien , AD. And Kaper ,JB.(1998). Shiga toxin – producing *Escherichia coli*: today ,and tomorrow. In: Kaper, JB. And OBrien, AD. (Eds.) . *Escherichia coli 0157* : *H7* and other shia- toxin – producing *E.coli* strains. Washington: American Society for Microbiology P. 1-11.

100) Obrien. AD., Tesh, VI, Donohue- Rolfe, A., Jackson, MR., Olsnes, S. and Sandvig, K.(1992). Shiga toxin: biochemirty, genetics, mode of action and role in pathogenesis. In: sansonetti, PJ (Ed.) . Pathogenesis of shigellosis. 180th ed. Berlin- Heidelberg: springer- erlag, P. 66-94.

101) Onesirosan, P., Mabuni, C. T., Durbin, R. D., Morin, R. B., Rich, D. H. and Arny, D. C.(1975). Toxin production by *Corynespora-Cassicola*. Physiol. Plant pathol. 5, 289- 295.

102) Owens, L. D. and Wright, D. H. (1965 a). Rhizobial- induced chlorosis in soybeans: isolation, production in nodules and varietal specificity of the toxin. Plant physiol. 40, 927- 930.

103) Owens, L. D. Lieberman, M., and Kunishi, A. (1971). Inhibition of ethylene production by rhizobitoxine. Plant physiol. 48, 1- 4.

104) Owens, L. D., Thompson, J. F. and fennessey, P. V. (1972a). Dihydrorhizobio toxin, anew other amino- acid from *Rhizobium Japonicum*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1972, 715.

105) Owens, L. D., Thompson, J. F., Pitcher, R. G. and Williams, T. (1968). Rhizobum synthesized phyto toxin: an inhibitor of cystathionase in *Salmonella typhimurium*. Bio chem: Biophys. Acta 158, 219- 225.

106) Owens, L. D., Thompson, J. F., Pitcher, R. G. and Williams,

T.(1972 b). Structure of rhizobitoxin, an antimetabolic enol- ether amino- acid from *Rhizobium Japonicum*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1972, 714.

107) Owens, L. F. and Wright, D. A.(1965 b). Production of the soybean chlorosis toxin by *Rhizobium japonicus* in pure culture. Plant physiol. 40, 931- 933.

108) Paddock, W. C. (1953). Histological study of suscept- pathogen relution ships between *Helminthosorium. Victoriae* M. and M. Seeding Oat leaves. N. Y. Agric: Exp. Sta. Ithaca Mem. 315.

109) Patil, S. S.(1974). Toxins produced by phyto pathogenic bacteria. Ann. Rev. Phyto pathol. 12, 259- 279.

110) Patil, S. S., Hayward, A. C. and Emmons, R. (1974). An vltra violet- induced nontoxigenic mutant of *pseudomonas phaseolicola* of altered pathogenicity. Phyto pathology 64, 590- 595.

111) Patil, S. S., Tam, L. Q. and Sakui, W. S. (1972). Mode of action of the toxin from *pseudomonas phaseolicola*. I. Toxin specificity, Chlorosis, and ornithine accumulation. Plant physiol. 49, 803- 807.

112) Patil, S. S., Youngblood, P., Christiansen, P. and Moore, R. E.(1976). Phaseotoxin A: an antimetabolite from *pseudomonas phaseolicola*. Bio chem. Bio phys. Res. Commun. 69, 1019- 1027.

113) Paynter, V. A. and Alconero, R. (1979). A specific Fluorescent antibody for detection of syringomycin in infected peach tree tissues. Phyto pathology 69, 493- 496.

114) Pegg. G. F. (1976). Endogenous auxins in healthy and diseased plants. In "physiological plant pathology." (R. Heitefuss and P. H. Williams, eds.), PP.560- 581. Springer- Verlag, Berlin and New York.

115) Pringle, R. B. and Scheffer, R. P.(1964): Host- specific plant toxin. Annu. Rev. Phyto pathol. 2, 133- 156.

116) Rai, P. V. and Strobel, G. A. (1969). Phytotoxic glycopeptides produced by *Corynebacterium michiganense* II. Biological properties. Phyto pathology 59, 53- 57.

117) Ribeiro, R. De L. D., Durbin, R. D., Army, D. C. and Uchytil, T. F.(1977). Characterization of the bacterium inciting chocolate spot corn. Phyto pathology 67, 1427- 1431.

118) Ries, S. M. and Strobel, G. A.(1972). Biological properties and pathological role of aphytotoxic glycopeptides from *Corynebacterium insidiosum.* Physiol. Plant pathol. 2, 133- 142.

119) Roberts, M. and Boyce, C. B. C. (1972). Principles of biological assay. In "Methods in Microbiology" (J. R. Norris and D. W. Ribbons, eds.). Vol 7A, PP. 153- 190. Academic press, New York.

120) Rowely, J.B., Ronghui, XU. And Patil, S.S. (2000). Molecular analysis of thermoregulation of phaseolotoxin–resistant ornithine carbamoyl transferase (argk) from *pseudomanas syringae pv. Phaseolicola.* MPMI. 30 , 1071-1080

121) Rudolph, K. (1976). Non. Specific toxin. In: physiological plant pathology, (H. Heitefuss and P. Lt. Williams, eds.), PP. 280- 315. Springer- Verlay, Berlin and New York.

122) Rudolph, K. and Rasche, E.(1979). A leaf bioassay for semiquantitative determina toxin of phaseolicola. Phyto pathol. 2. 96, 215- 221.

123) Rudolph, K. and Stahmann, M. A.(1966). The accumulation of L-ornithine in halo- blight infected bean plants(phasolus vulgaris L.) induced by the toxin of the pathogen *pseudomonus phaseolicola* (Burkh) Dowson. Phyto pathol. 2. 51, 29- 46.

124) Scheffer, R. P.(1976). Host specific toxins in relation to pathogenesis and disease resistance. In " Physiological plant pathology" (R. Heitefuss and P. H. Williams, eds.), PP. 247- 269. Springer- Verlag. Berlin and New York.

125) Scheffer, R. P. and Briggs, S. P.(1981). In troduction : a perspective of toxin studies in plant pathology. In: Toxins in plant Disease. (Ed. By R. D. Durbin), PP. 1- 17. Academic press. New York.

126) Scheffer, R. P. and Pringle, R. B. (1967). Pathogen- produced determints of disease and their effects an host plant. In "The Dynamic Role of Molecular constituents in plant- parasite interaction" (C. J. Mirocha and I. Vritani, eds.), PP. 217- 236. Bruce. Publ. Co., St. Paul. Minn esotta.

127) Schiavo, G. and Montecucco, C. (1997) . The structure and mode of action of botulinum and tetanus toxins. In : Rood JI , Mclane, BA., songer, JG and Titball, REW.(Eds.) (197) . The clostridia: Molecular biology and pathogenesis. San Diego. P. 295-322.

128) Schlessinger, D. and shaechter, M. (1993). Bacterial toxin In:

Schaechter, M., Medoff, G. and Eisenstein, BI. 2nd edition. Baltimore: William and Wilkins. P. 162-175 .

129) Sequria, L.(1973). Hormone metabolism in diseaed plants. Ann. Rev. Plant physiol. 24, 353- 380.

130) Shaw, P. D.(1981). Production and Isolation. In " Toxins in plant disease." (Ed. By R. D. Durbin). PP. 21-40. Academic press. New York.

131) Sinden, S. L. and Durbin, R. D. (1968). Glutamine synthitase inhibition: possible Mode of action of wildfire toxin from *pseudomonas tabaci.* Nature (London) 219, 37- 380.

132) Sinden, S. L. and Durbin, R. D.(1970). A comparison of the chlorosis- inducing toxin from *pseudomonas coronafaciens* with wildfire toxin from *Pseudomonas tabaci.* Phyto pathology- 60, 360- 364.

133) Sinden, S. L., De Vay, J. E. and Backman, P. A.(1971). Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae,* and its role in bacterial canker- disease of peach trees. Physiol. Plant pathol. 1, 199- 213.

134) Sinden, S. L., Durbin, R. D., Uchytil, T. E. and Lamar, C., Jr.(1969). The production of convulsions by an exotoxin from *Pseudomonas tabaci.* Toxicol. Appl. Pharmacol. 14, 82- 88.

135) Singh, BR., Li, B. and Read, D. (1995). Botulimum versus tetanus neurotoxins: why is botulinum neurotioxin but not tetanus neurotoxin a food poison? Toxicon, 33, 1541-1547 .

136) Sjulin, T.M. and Beer, S.V. (1978). Mecahanism of wilt induction by amylovorin in cotoneaster shoots and it's relation to wilting of shoots infected by *Erwinia anylovora.* Phytopathology 68, 89-94.

137) Skotncki, M.L., B.G.(1978) Transfer of nitrogen Fixation genes from a bacterium with the characterstics of both *Rhizobium* and *Agrobacterium.* J.of.Bacteriol. 133, 518-526.

138) Smith, A. G. and Rubery, P. H.(1979). N-phosphoglutaonate does not behave as an active component of the exotoxin of *pseudomonas phaseolicola*, the causative agent of halo blight of beans. Physiol. Plant pathol. 15, 264-278.

139) Smith, A. G. and Rubery. P.M (1982). Investigation of the mechanism of action of a chlorosis-induing toxin produced by

pseudomonas phaseolicola. Plant physiology. 70, 932-938.

140) Song, L., Hobaugh MR., Shustak, C., Cheley, S., Baylay, H. and Gouaux, JE. (1996). Structure of staphylococcal alph- hemolysin, a heptameric transmembrane pore. Science 274, 1859-1566.

141) Song, L., Hobaugh , Mr., Shustak, C. cheley, S., Bayley, H. and Gouaux, JE. (1996) . Structure of Staphylococal alpha – hemolysin , a heptameric transmembrane pore. Sceince. 274, 1859-1566.

142) Songer, J. G. (1997) . Bacterial phospholipase and their role in virulence. Trends Microbiol. 5 , 156-161 .

143) Spencer. J. F. T. and Gorin, P. A. J. (1961) The occurrence in the host plant of physiologically active gums produced by *Corynebacterum insidosum* and *Corynebacterium Sepedonicum*. Con. J. Microjbiol. 7, 185-188.

144) Stanier, R. Y., Adelberg, E. A. and Ingraham, J. L.(1977). General microbiology. 4th ed. The Macmillan press LTD.

145) Starr, M. P.(1983). Phyto pathogenic bacteria. Springer- Verleg. Berlin and New York.

146) Staskawicz, B. J. and Panopoulos, N. J. (1979). A rapid and sensitive microbiological assay for phaseolotoxin. Phytopatholgy 69, 663- 666.

147) Staskawicz, B. J., Panopoulos, N. J. and Hoogenraad, N. J.(1980). Phaseolotoxin. Insensitive ornithine carbamoyl Transferase of *Pseudomonas syringae Pv. Phaseolicola*: Basis for immunity to phaseolotoxin. T. Bacteriol. 142, 720- 723.

148) Steen, E. B.(1971). Dictionary of biology. Barnes and Noble books. New York.

149) Stephen, J.and Pietrowski, R. A. (Eds).(1991). Bacterial toxins (Aspects of Microbiology2). Nelson. Hong Kong.

150) Stewart, W. W.(1971). Isolation and proof of structure of wildfire toxin. Nature (London) 224, 174- 178.

151) Stoessl, A.(1981). Structure and biogenetic relations: Fungal non host- specific. In " Toxin in plant disease". (Ed by R. D. Durbin). PP. 110- 220. Academic press, New York.

152) Strobel, G. A.(1967). Purification and properties of a phytotoxic polysaccharide produced by *Corynebacterium sepedonicum* plant physiol. 42, 1433- 1441.

11

153) Strobel, G. A.(1977). Bacterial phyto toxins. Ann. Rev. Microbiol. 31, 205-224.

154) Strobel, G. A., and Hess, W. M.(1968). Biological activity of a phyto toxic glyogpeptide produced *Coryne bacterium sepedonium.* Plant physiol. 43, 1673- 1688.

155) Styer, D. J., Worf, G. L. and Durbin, R. D.(1980). Occurrence in the united state of a marigold leaf spot incited by *pseudomonas tagetis.* Plant Dis. 64, 101-102. By *Psendomonas tagetis.* Plant Dis. 64, 101- 102.

156) Taha, R. R.(1984). Studies on tabtoxin. Ph. D thesis. University of East Anglia school of biological sciences. England.

157) Tamari, K., Ogasaware, N. and Kaji, J.(1967). Biochemical response of plant to toxins produced by the rice blast fungus. In " The Dynamic role of molecular constituents in plant. Parasite Interaction. (C. J. Mirocha and I Uritani, eds.). PP. 203- 216. Am. Phyto pathol. SOC. St. Paul, Minnesota.

158) Templeton, G. E.(1972). Alternaria toxins related to pathogensis in plants. In "Microbial toxins" (S. Kadis, A. Ciegler, and S. J. Ajl, eds.), Vol. VIII, PP. 169- 192. Academic press, New York.

159) Tesh, VL. and O'Brein , AD. (1991). The pathogenic mechanisms of shiga toxin and shiga- like toxins. Mol. Microbiol 5 , 1817-1822.

160) Timbury, M.C., Mccarthey, A.C., Thakker, B. and Ward, K.N. (Eds.) (2002). Note on Medical Microbiology 1st edition. Elsevier Science Limited. Churchill Livingstone.

161) Todar, J. (Ed.). (2007). The mechanisms of bacterial pathogenicity. Text book of bacteriology, University of Wisconsin Madison .

162) Todar, K. (Ed.) . (2008) Mechanisms of bacterial pathogenicity: protein Toxins. Text book of bacteriology. University of Wisconsin- Madison.

163) Trimboli, R., Fahy, P. C. and Baker, K. F.(1978). Apical chlorosis and leaf spot of tagetes spp. Caused by *Pseudomonas tagetis Hellmers.* Aust. J. Agric. Res. 29, 831-839.

164) Turner, J. G.(1981). Tabtoxin, produced by *Pseudomonas tabaci,* decreases *Nicotiana tabacum* glutamine synthetase and causes accumulation of ammonia. Physiol. Plant pathol. 19, 57- 67.

165) Turner, J. G.(1984). Role of toxins in plant disease. In plant disease: infection, damage and loss. Ed by Wood, R. K. S. and Jellis, G. J.).PP 3-12. Blackwell scientific publication, Oxford.

166) Turner, J. G. and Debbage, J. M.(1982). Tabtoxin incluced symptoms are associated with the accumulation of ammonia formed during photorespiration. Physiol. Plant Pathol. 20, 223- 233.

167) Turner, J. G., Taha, R. R.and Debbage, J. (1986). Effects of tabtoxin on nitrogen metabolism. Physiol. Plant. 67, 649- 653.

168) Turner, J. G. and Taha, R. R.(1984). Contribution of tabtoxin to the pathogenicity of *pseudomonas syringae pv tabaci.* Physiol. Plant pathol. 25, 55- 69.

169) Uchytil, T. F. and Durbin, R. D.(1980). Hydrolysis of tabtoxins by plant and bacterial enzymes. Experientia 36, 301- 302.

170) Van Alfen, N. K. and Turner, N. C. (1975). Changes in alfa lfa stem conductance induced by *Corynebacterium insideosum* toxin: Plant physiol. 55, 559- 561.

171) Walton, J. D., Earle, E. D., Yoder, O. C. and spanswich, R. M.(1979). Reduction of adenosine triphosphate levels in susceptible maize mesophyll photoplasts by *Helmin thosporium maydis* race T toxin. Plant physiol. 63, 806- 810.

172) Wheeler, AH.(1997). Therapeutic uses of botulinum toxin . Am. Fam . Physician . 55.541-548.

173) Wheeler, H. (1977). Ultrastructure of penetration by *Helminthos porium maydis.* Physiol. Plant pathol. 11, 171- 178.

174) Wheeler, H. E.(1953). Detection of microbial toxins by the use of radioisotopes. Phyto pathology. 43, 236- 238.

175) Wheeler, H.(1981). Role in pathogenesis. In Toxins in plant disease. (Ed. By R. D. Durbin). PP. 477- 494. Academic press. And London.

176) Wheeler, H. and Ammon. V. D.(1977). Effects of *Helminthosporium maydis* T- toxin on the up take of uranyl salt in corn roots. Phyto pathology, 67, 325-330.

177) Wheeler, H. and Luke, H. H. (1963). Microbial toxin in plant disease. Annu. Rev. Microbiol. 17, 223- 242.

178) Wick , M.J. and Iglewski, BH. (1990) In: Moss, J.and Vaughan

M.(Eds.) APD- Ribosylating toxins and g proteins. Washington: American Society for Microbiology. P31-43.

179) Woolley, D. W., Pringle, R. B. B. and Braun, A. C.(1952). Isolation of the phytopathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*, an antagonist of methionine. J. Biol. Chem. 197, 409- 417.

180) Woolley, D. W., Schaffner, G. and Braun, A. C.(1955). Structure of the phyto pathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*. J. Biol. Chem. 215, 485- 493.

181) Yoder, O. C.(1981). Assay. In " toxins in plant disease" (Ed. By R. D. Durbin) PP. 45- 78 .

182) Yoder, O. C. and Scheffer, R. P.(1969). Role of toxin in early interactions of *Helminthosporium victoriae* with susceptible and resistant Oat tissue. Phyto pathology. 59, 1954- 1959.

انتهى بعون الله

العنوان الالكتروني للمؤلف
Rihab_azawii@yahoo.com

علم سموم البكتيريا

TOXINOLOGY







دار المناهج للنشر والتوزيع
Dar Al-Manahej Publishers

عمان-شارع الملك الحسين- عمارة الشركة المتحدة للتأمين
هاتف ٤٦٥٠٦٢٤ ص. ب ٢١٥٣٠٨ عمان ١١١٢٢ الأردن
www.daralmanahej.com
info@daralmanahej.com